



Analyse de la recombinaison des gènes TCRAD : réarrangements radio-induits et structure des jonctions signal.

Cédric Touvrey

► To cite this version:

Cédric Touvrey. Analyse de la recombinaison des gènes TCRAD : réarrangements radio-induits et structure des jonctions signal.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00175283

HAL Id: tel-00175283

<https://theses.hal.science/tel-00175283>

Submitted on 27 Sep 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier-Grenoble I
UFR de Biologie

THESE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Joseph Fourier
(Arrêtés ministériels du 5 Juillet 1984 et du 30 Mars 1992)

Spécialité : Biologie

Présentée par

Cédric TOUVREY

**Analyse de la recombinaison des gènes TCRAD :
Réarrangements radio-induits et structure des jonctions
signal**

Soutenue le 12 septembre 2005, devant le jury suivant :

Pr. Stefan NONCHEV	Président
Dr. Bertrand NADEL Dr. Janet MARYANSKI	Rapporteurs
Dr. Patrice MARCHE Dr. Serge CANDEIAS	Examineurs

Thèse préparée au laboratoire d'Immunochimie, INSERM U548
CEA-Grenoble / Département de Réponse et Dynamique Cellulaire
Université Joseph Fourier

Je voudrais en premier lieu exprimer toute ma reconnaissance à Serge pour toutes les connaissances qu'il m'a transmises au cours de ces 5 ans passés ensemble. Le « gamin » était parfois difficile à vivre mais tout s'est toujours déroulé dans la bonne humeur. Ces quelques lignes marquent la fin de la période d'écriture qui t'a beaucoup mobilisé. Profite bien de tes vacances aux 3R...

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de ces cinq années et avec qui j'ai passé de bons moments aussi bien scientifiques que personnels. Je ne vous remercierai pas tous nommément mais je suis certain que vous vous reconnaîtrez.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir permis de m'incruster sur les bancs de la fac et pour tout le reste.

De gros bisous à ma petite Puce et merci d'avoir essayé de compenser mes carences en orthographe.

Merci aux Docteurs Marche Patrice et Jouvin-Marche Evelyne pour m'avoir accueilli dans le laboratoire et donné l'occasion de découvrir ce que pouvait être le monde de la recherche et la vie dans un labo. J'en ai retiré une expérience non négligeable.

Je souhaiterais enfin remercier les Docteurs Janet Maryanski et Bertrand Nadel pour avoir accepté la lourde tâche de lire mon manuscrit de thèse dans un laps de temps aussi serré. Enfin merci au Professeur Stefan Nonchev pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je vous souhaite à tous une agréable lecture.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
1. LE TCR	10
1.1. Les chaînes du TCR	10
1.2. Le complexe CD3	11
1.3. La transduction du signal	15
1.3.1. Motifs ITAM	16
1.3.2. Lck, Fyn	16
1.3.3. ZAP70, Syk	16
1.3.4. LAT, SLP76, GADS et autres protéines adaptatrices	17
1.3.5. Régulation négative	19
2. LE REARRANGEMENT DES GENES TCR	20
2.1. Organisation des Loci TCR	20
2.1.1. Nomenclature	20
2.1.2. Locus TCRB	20
2.1.3. Locus TCRG	21
2.1.4. Locus TCRAD	22
2.2. La recombinaison V(D)J	24
2.2.1. RAG-1 et RAG-2	24
2.2.2. Le complexe DNA-PK	25
2.2.3. Artemis	29
2.2.4. Le complexe XRCC4-DNA Ligase IV	30

2.3. Diversité du répertoire TCR	30
2.3.1. Diversité combinatoire	30
2.3.1.1. Combinaisons des gènes V(D)J	30
2.3.1.2. Appariement des chaînes TCR	32
2.3.2. Diversité jonctionnelle	33
2.3.2.1. Nucléotides Palindromiques	33
2.3.2.2. Délétions	33
2.3.2.3. Nucléotides N	34
2.4. Régulation de la recombinaison	35
2.4.1. Régulation de l'expression des gènes et protéines RAG	36
2.4.2. Accessibilité des Loci	37
2.4.3. Enhanceurs	38
2.4.4. T Early α (TEA)	40
2.5. Restriction des réarrangements au-delà de la règle 12/23	41
3. LE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T	43
3.1. Le thymus	43
3.2. Les précurseurs	43
3.3. Différenciation des thymocytes	45
3.3.1. Stade DN	45
3.3.2. Stade DP	47
3.3.3. Le réarrangement TCRA	48
3.3.4. La sélection thymique	48
3.3.4.1. La sélection positive	49
3.3.4.2. La sélection négative	49
3.3.5. Stade SP	51

3.4. Sélection β et pré-TCR	53
3.5. Choix du lignage $\alpha\beta/\gamma\delta$	54
3.5.1. Rôle du pré-TCR	54
3.5.2. Implication de Notch	55
3.5.3. Finalisation de l'engagement dans la voie LT $\alpha\beta$ par le réarrangement de δ Rec-1	57
4. STRESS RADIATIF ET DIFFERENCIATION	59
4.1. Souris SCID et différenciation radio-induite	59
4.2. Souris RAG^{-/-} et différenciation radio-induite	61
5. OBJECTIFS DE LA THESE	63

RESULTATS

Rôle de P53 et de la signalisation pré-TCR like dans la différenciation radio-induite

Article 1	65
p53-dependent and p53-independent pathways for radiation-induced immature thymocyte differentiation.	
Candéias SM, Mancini SJ, Touvrey C, Borel E, Jouvin-Marche E, Marche PN.	
Oncogene. 2004;23(10):1922-9.	
Article 2 et résultats complémentaires / conclusions	68
Radiation induced immature thymocyte differentiation unravels multiple pre-TCR-derived signal pathways. Candéias SM, Touvrey C, Mancini SJ, Azizi Samir LA, Borel E, Colin V, Malissen M, Jouvin-Marche E, Marche PN	

Structure des jonctions signal et implication des protéines de réparation et de maintien de la stabilité génomique.

Article 3 ----- 75

Gene specific signal joint modifications during V(D)J recombination of murine and human TCRAD locus genes.

Touvrey C, Borel E, Marche PN, Jouvin-Marche E, Candéias SM.

Resultats complémentaires ----- 81

Implication des facteurs associés à la réparation par NHEJ et au maintien de la stabilité du génome dans la formation des jonctions signal.

6. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES ----- 98

7. BIBLIOGRAPHIE -----102

ABREVIATIONS

AA : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATM : « Ataxia telangiectasia mutated »

C : Segment génique constant

CDR : "Complementary Determining Region" (région hypervariable)

CIC : Complexe CD3 indépendant des TCR clonotypiques

CJ : Jonction codante

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

D : Segment génique de diversité

DN : Double négatif

DNA-PK : Protéine kinase activée par l'ADN

DP : Double positif

DSB : Cassure d'ADN double brin

δ Rec-1 : Delta deleting element 1 (élément de délétion du locus TCRD)

EC : Extrémité codantes

ES : Extrémité signal

HS : "Hot Spot"

HSC : Cellule souche hématopoïétique

Ig : Immunoglobuline

ISP : Immature simple positif

ITAM : "Immuno Tyrosine based Activation Motif"

J : Segment génique de jonction

JC : jonction codante

JS : Jonction signal

kb : Kilobase

kD : Kilodalton

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

MAP-Kinase : Protéine kinase activée par les mitogènes

PTK : Protéine tyrosine kinase

Pb: Paire de base

RAG : "Recombination Activating Gene"

RSS : Séquence signal de recombinaison « Recombination signal sequence »

SP : Simple positif

SCID : Déficiency sévère immune combinée

TCR : Récepteur à l'antigène des cellules T

TdT : Terminal désoxynucléotidyl transférase

TREC : Cercle d'excision des récepteurs T

V : Segment génique de variabilité

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le système immunitaire permet d'assurer l'intégrité de l'individu face aux agents pathogènes, aux substances étrangères et aux cellules anormales de l'organisme. L'immunité innée ou non spécifique représente la première ligne de défense de l'organisme. Sa mise en place est précoce et non spécifique de l'antigène. Elle permet d'éliminer les agents infectieux en quelques jours ou de retarder leur propagation. Elle consiste en un premier rempart physique constitué par la peau et les membranes muqueuses. La peau joue le rôle d'interface entre l'individu et l'extérieur et empêche la pénétration de la majorité des agents pathogènes. Les muqueuses que l'on retrouve au niveau de toutes les portes d'entrées naturelles sont constituées de cellules épithéliales sécrétant des agents bactéricides et anti-viraux permettant l'élimination des pathogènes après leur immobilisation par les cellules ciliées et le mucus les tapissant. Lorsque l'intégrité de cette barrière est compromise par une blessure ou une dégradation des tissus, l'agent infectieux peut pénétrer l'organisme. Il est alors confronté aux cellules du système immunitaire inné postées dans les tissus. Ce sont principalement des macrophages et des cellules dendritiques. Ces cellules dérivent des cellules souches hématopoïétiques et comportent à leur surface des récepteurs qui reconnaissent un signal de danger constitué le plus souvent par une molécule conservée présente à la surface des agents infectieux. Ces récepteurs sont capables d'initier une réponse inflammatoire aiguë en permettant la synthèse d'agents anti-microbiens et de cytokines pro-inflammatoires par les cellules qui les portent. Cette inflammation aussi provoquée par des médiateurs provenant des pathogènes eux mêmes ainsi que par la mort des cellules infectées va provoquer une vasodilatation et une augmentation locale de la perméabilité des capillaires. Ce phénomène permet le recrutement des phagocytes sur les lieux de la pénétration des micro-organismes. La phagocytose par les macrophages et les neutrophiles est facilitée par l'opsonisation des pathogènes par les molécules du complément. L'activation du complément permet aussi la formation de complexes d'attaque membranaire sur les agents infectieux puis leur lyse.

L'inflammation recrute aussi les cellules NK (Natural killers). Ces cellules représentent entre 5 et 20% des lymphocytes sanguins chez l'homme. Elles possèdent une activité cytotoxique naturelle régulée par les récepteurs KIR (Killer inhibitory receptor). Les KIR inhibent l'activité cytotoxique des NK lorsqu'ils reconnaissent les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) présentes en surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Ce mécanisme restreint la lyse aux cellules transformées ou infectées qui présentent une baisse du niveau d'expression de ces molécules.

Les cellules dendritiques (DC) immatures capturent l'antigène par endocytose ou macropinocytose de manière très efficace. Cette rencontre avec l'antigène provoque la maturation des DC. Cette maturation s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels. Les DC vont développer des dendrites, augmenter l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à leur surface et exprimer des molécules de co-stimulation. Elles vont protéolyser l'antigène tout en migrant vers les organes lymphoïdes secondaires et présenter une forte densité de complexes CMH/peptide antigénique à leur surface. Arrivées dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'infection, les DC vont pouvoir activer spécifiquement les lymphocytes T (LT) naïfs et initier la réponse immunitaire adaptative.

L'immunité adaptative ou spécifique est médiée par les cellules B et les cellules T principalement. Les lymphocytes B (LB) se développent dans la moelle osseuse. Ils possèdent à leur surface des immunoglobulines (Ig) spécifiques d'un antigène (Ag). Ces anticorps de surface ou BCR leur permettent de fixer l'antigène. Le complexe antigène/BCR est ensuite internalisé et dégradé dans les lysosomes. Les peptides générés sont chargés dans les molécules de CMH II et le complexe est exprimé en surface du LB pour être présenté aux LT $CD4^+$. L'activation des LB permet l'initiation de la réponse à médiation humorale. Les LB produisent dans ce cadre des anticorps ou immunoglobulines reconnaissant un antigène natif. Les Ig sécrétées vont se fixer sur les Ag, les neutraliser et favoriser leur capture par les cellules phagocytaires. Les cytokines produites vont aussi participer à l'activation des LT ainsi qu'au recrutement des cellules de l'immunité innée qui vont participer à la phagocytose de l'antigène.

Les cellules présentatrices de l'antigène comme le LB et les DC dégradent l'antigène en peptides qui sont présentés dans le cadre des molécules du CMH au LT. Il existe deux types de LT : les LT $CD4^+$ qui reconnaissent un complexe peptide/CMH de classe II. Ces lymphocytes « helper » permettent une amplification de la réponse immunitaire par le biais de leur sécrétion d'interleukines. Les LT $CD8^+$ reconnaissent un peptide présenté par les molécules de classe I du CMH et ont une action directe de lyse des cellules infectées. L'action conjointe du système immunitaire inné et adaptatif permet d'éliminer la plupart des pathogènes.

Pour faire face à l'immense diversité des antigènes, le système immunitaire a mis en place un répertoire extrêmement large de récepteurs à l'antigène. La partie variable des chaînes polypeptidiques composant le TCR et le BCR est codée par un exon assemblé par recombinaison somatique dirigée de plusieurs segments géniques. Ce processus est appelé

recombinaison V(D)J et fait appel à des protéines spécifiques des lymphocytes et des protéines ubiquitaires du système de réparation de l'ADN. L'ensemble des événements conduisant à l'expression d'un TCR fonctionnel se déroule lors de la maturation des précurseurs dans le thymus. Le thymocyte subit une sélection rigoureuse afin de s'assurer qu'il ne réagira pas contre le soi et que son récepteur est fonctionnel. A l'issue de sa maturation le lymphocyte naïf gagne alors la périphérie pour participer à la diversification du répertoire périphérique. La taille de la population LT et la diversité de son répertoire en périphérie sont alors influencées par la rencontre d'antigène et par les processus d'homéostasie.

Au cours de mon manuscrit, nous nous intéresserons à la structure du TCR et aux mécanismes de réarrangement des gènes codant pour les chaînes du TCR. La différenciation des lymphocytes T et sa régulation seront ensuite abordées. Ces deux événements sont étroitement liés puisque la régulation des réarrangements et l'expression des chaînes TCR vont contrôler la différenciation des thymocytes. Toute déficience dans la recombinaison V(D)J ou dans la cascade de signalisation issue du pré-TCR et du TCR bloque au moins partiellement la maturation des thymocytes. Ce blocage peut parfois être levé en partie grâce à un stress radiatif. L'effet de ce stress n'est pas encore pleinement compris et nous l'avons analysé plus en détail dans la partie « résultats ». Dans cette partie nous avons aussi étudié les mécanismes de formation des jonctions signal (JS) portées en général par des TRECS (T cell receptor excision circle) afin de mieux caractériser l'effet de l'irradiation sur le réarrangement de gènes TCR. Cette étude nous a permis de mieux comprendre des mécanismes du réarrangement des gènes codants pour les chaînes du TCR. Nous avons aussi étudié l'implication de protéines ubiquitaires de réparation de l'ADN par recombinaison non homologue ainsi que l'influence de protéines de maintien de la stabilité du génôme. Tous ces résultats sont ensuite discutés dans la dernière partie de cette thèse.

1. LE TCR

Le récepteur à l'antigène des cellules T (TCR) est composé de deux chaînes polypeptidiques α et β ou γ et δ associées au complexe CD3 (Figure 1). Le TCR est exprimé de façon clonale à la surface des LT. Dans 95% des cas les LT expriment un TCR $\alpha\beta$. Les chaînes polypeptidiques possèdent un domaine variable V qui assure la reconnaissance du peptide antigénique tandis que les sous unités du complexe CD3 permettent la transduction intracellulaire du signal d'interaction TCR /CMH-peptide.

1.1. Les chaînes du TCR

L'hétérodimère, qu'il soit $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, est composé de deux chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un pont disulfure. Chacune de ces chaînes est composée de deux domaines en forme de boucle maintenue par un pont disulfure possédant ainsi une structure de type domaine d'immunoglobuline :

Une large partie extra cellulaire en 5' formée de deux domaines de type immunoglobuline : le domaine variable servant à la reconnaissance de l'antigène et le domaine constant. Le domaine variable des TCR possède 3 régions hypervariables CDR (complementary determining region). Alors que la CDR1 et la CDR2 sont codées de façon germinale par les gènes V, la CDR3 est codée par la juxtaposition des segments V, D et J réarrangés pour former le gène de la chaîne du TCR considérée. La résolution de la structure cristallographique d'un complexe TCR/CMH-peptide a mis en évidence le rôle crucial de ces régions dans la fonction du TCR (Figure 1). La région CDR1 interagit directement avec le peptide et le CMH. La CDR2 interagit avec le CMH, tandis que la région la plus hypervariable, la CDR3, reconnaît directement le peptide (Garcia et al., 1996). Des données récentes montrent qu'en fait les règles d'interactions des CDR avec le CMH et le peptide sont très variables (Housset and Malissen, 2003).

Une vingtaine d'acides aminés (AA) organisés en hélice alpha assurent l'ancrage de la chaîne protéique dans la membrane. La plupart sont hydrophobes et certains AA chargés négativement interagissent probablement avec les résidus chargés positivement des chaînes du complexe CD3. La partie transmembranaire est prolongée par un très court segment intracytoplasmique. Cette queue intracellulaire ne semble pas impliquée dans la transduction du signal.

Le squelette polypeptidique des chaînes α et β pèse respectivement 28 et 32 Kd mais celles-ci sont en réalité plus lourdes du fait de glycosylation en N. La chaîne TCR γ est une protéine de 32 Kd associée par un pont disulfure à une chaîne TCR δ de 45 Kd. Leur structure est semblable à celle des chaînes α/β .

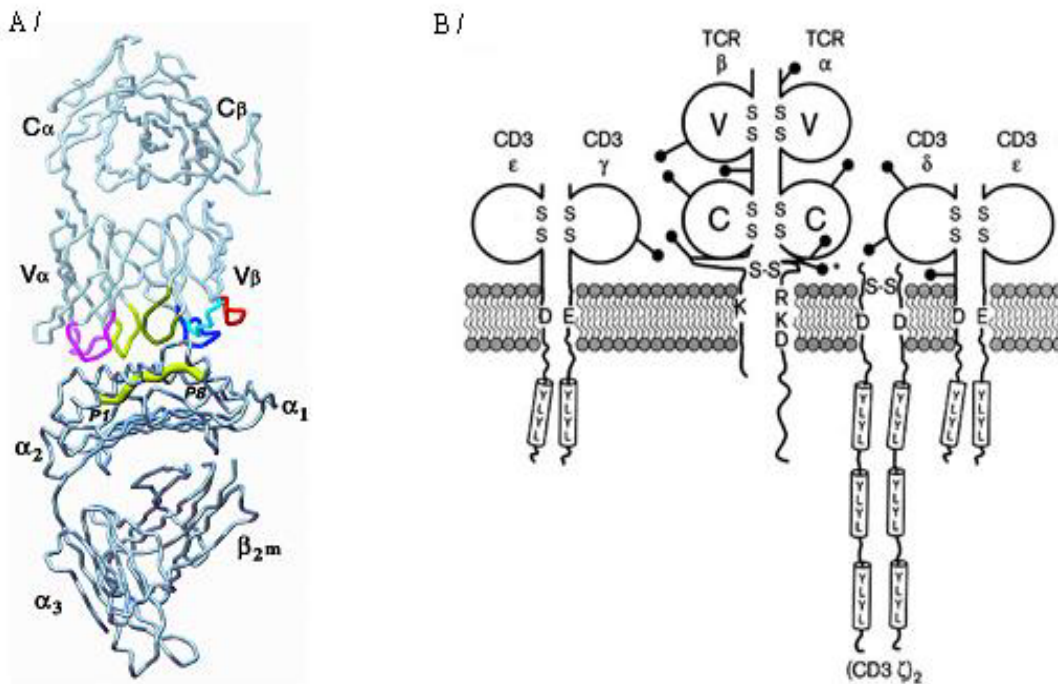


Figure 1 : (A) Structure cristallographique d'un hétérodimère TCR $\alpha\beta$ associé à un complexe CMH I/peptide. Le TCR est représenté dans la partie supérieure de la figure. Les régions CDR des domaines V α et V β sont indiquées: CDR1 α et CDR2 α = rose; CDR1 β et CDR2 β = bleu; CDR3 α et CDR3 β = jaune. La molécule de classe I du CMH est représentée dans la partie inférieure de la figure. Le peptide P1-P8 présent dans la gouttière du CMH I est représenté en jaune. D'après Garcia *et al.*, 1996. (B) Structure schématique du TCR $\alpha\beta$. Les domaines extracellulaires de type Ig sont représentés par des boucles. Les ponts disulfures sont notés (S S). Les principaux AA transmembranaires participant à l'assemblage du TCR sont représentés par leur code à une lettre. Les cylindres dans lesquels sont représentés des résidus tyrosine et lysine correspondent aux motifs ITAM portés par la partie intracellulaire des chaînes du complexe CD3.

1.2. Le complexe CD3

Les gènes codant pour les chaînes invariantes CD3 gamma (CD3 γ), delta (CD3 δ) et epsilon (CD3 ϵ) sont regroupés sur le chromosome 9 chez la souris (Letourneur et al., 1989). La structure du locus, la forte homologie de séquence entre les 3 protéines et le partage de

leurs éléments de régulation suggère une évolution à partir d'un ancêtre commun (Dzialo and Cooper, 1997). Le gène codant pour la chaîne CD3 ζ est localisé sur le chromosome 1 de la souris. Il est constitué de 10 exons dont l'épissage alternatif donne les isoformes CD3 η ou CD3 θ . Seule la partie C-terminale diffère entre les 3 isoformes (Clayton et al., 1991; Clayton et al., 1992).

Les thymocytes immatures expriment faiblement à leur surface un complexe clonotype indépendant (CIC) composé de dimères de molécules de CD3 ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$ ou $\zeta\zeta$) (Grassi et al., 1999; Wiest et al., 1994). En présence d'anticorps anti CD3 ϵ , les CIC délivrent un signal qui permet la reprise de la différenciation des thymocytes de souris RAG $^{-/-}$ et SCID jusqu'au stade double positif (DP) CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ (Jacobs et al., 1994; Levelt et al., 1993). Ces complexes partiels sont donc fonctionnels.

Le complexe CD3 porté sur les cellules matures est composé de quatre chaînes polypeptidiques invariantes CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , et CD3 ζ qui s'associent pour former trois dimères : un hétérodimère $\gamma\epsilon$, un hétérodimère $\delta\epsilon$ et un homodimère zêta $\zeta\zeta$ ou un hétérodimère $\zeta\eta$. Pour être fonctionnels et exprimés en surface du LT, les TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ doivent être associés au complexe CD3. Réciproquement, l'absence de chaîne TCR α ou β provoque un blocage du trafic intracellulaire du complexe CD3 avant le trans golgi (Jacobs et al., 1994).

L'assemblage du TCR nécessite des résidus basiques présents dans les domaines transmembranaires des chaînes du TCR (Alcover et al., 1990; Blumberg et al., 1990). Ces résidus, une arginine et deux lysines vont interagir avec les résidus acides présents dans la partie transmembranaire des dimères $\delta\epsilon$ (deux acides aspartiques), $\gamma\epsilon$ (acides glutamique et acide aspartique), et $\zeta\zeta$ (deux acides glutamiques). Il y a tout d'abord interaction du dimère CD3 $\delta\epsilon$ avec la chaîne TCR α puis CD3 $\gamma\epsilon$ s'accroche à la chaîne TCR β . Pour finir l'homodimère $\zeta\zeta$ se lie à la chaîne TCR α (Figure 2). Cette dernière étape requiert absolument le préassemblage des deux autres dimères avec les chaînes TCR $\alpha\beta$ car elle n'a pas lieu dans les souris CD3 γ^{-} et CD3 δ^{-} (Call et al., 2002; Call et al., 2004).

Cette étude supporte donc un modèle monovalent (une chaîne α et β) et une stœchiométrie octavalente (TCR $\alpha\beta$ -CD3 $\gamma\epsilon$ -CD3 $\delta\epsilon$ -CD3 $\zeta\zeta$). D'autres modèles avec des valences différentes ont été proposés. Deux TCR distincts (2 chaînes α et 2 chaîne β) ou une chaîne α associée avec deux chaînes TCR β ont ainsi été retrouvés au sein du TCR (Fernandez-Miguel et al., 1999; Punt et al., 1994). La présence de complexes immatures du fait d'une contamination

lors de la purification des protéines de surface dans ces deux dernières études pourrait être la cause de ces divergences. La stœchiométrie du complexe TCR/CD3 reste donc encore discutée et il est possible qu'il existe plusieurs formes de complexe CD3 à la surface du TCR.

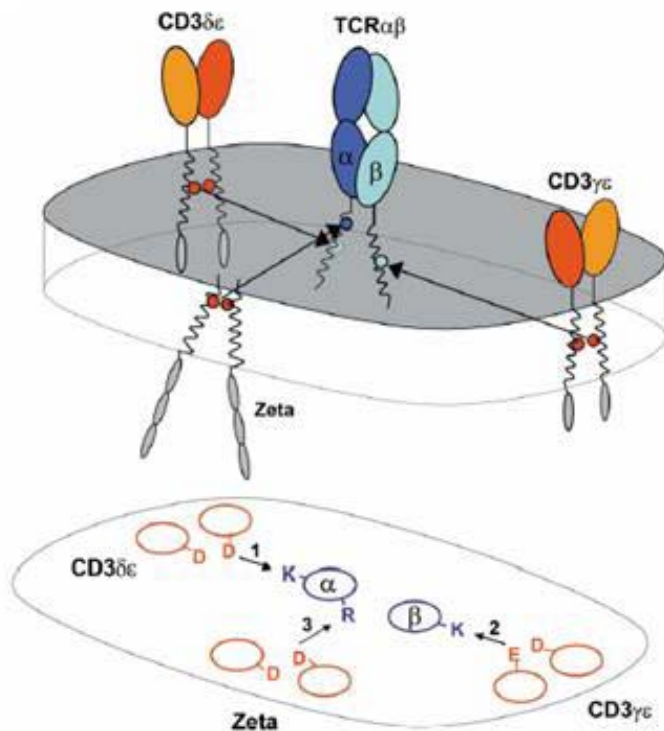


Figure 2 : Shématisation de l'assemblage du TCRαβ. Les 3 AA basiques des domaines transmembranaires des chaînes TCR interagissent avec les AA acides présents dans les trois dimères de signalisation CD3. Le dimère CD3δϵ s'associe d'abord avec la chaîne TCRα. La chaîne TCRβ s'associe ensuite avec le dimère CD3γϵ. Pour finir le dimère CD3ζζ est recruté par la chaîne TCRα. Les flèches numérotées symbolisent l'ordre d'assemblage. Les AA de la partie transmembranaire des chaînes CD3, TCRα et TCRβ participant à leur interaction sont représentés par des ronds ou par leur code à une lettre. Figure de Call et al (Call et al., 2002).

Le domaine N terminal des protéines composant le complexe CD3 est extracellulaire et ces quatre chaînes possèdent un ou plusieurs motif(s) ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif) situé(s) dans leur domaine intracellulaire, directement responsable de leur fonctionnalité.

Le complexe CD3 assure la transduction du signal TCR (Samelson et al., 1985) grâce à au moins deux modules parallèles de transduction du signal composés des chaînes εδγ d'un côté et ζη de l'autre. La génération de souris n'exprimant pas un des composants du

complexe CD3 a permis de mettre en évidence le rôle de ses différentes chaînes. Leurs fonctions varient selon que l'on considère le pré-TCR ou le TCR et il peut s'agir d'une fonction de structure et/ou de signalisation.

CD3ε

L'utilisation d'anticorps anti CD3ε permet de restaurer la différenciation des thymocytes de souris RAG^{-/-} et de SCID bloqués au stade DN3 jusqu'au stade DP (Levelt et al., 1993). La signalisation via les ITAM de CD3ε semble donc nécessaire à la différenciation thymique entre le stade DN et DP. En accord avec ces résultats, l'inactivation du gène CD3ε par l'insertion d'une cassette neo provoque un blocage total de la différenciation au stade DN3 et une forte diminution de la cellularité thymique (Malissen et al., 1995). La contribution exacte de CD3ε au fonctionnement du pré-TCR reste cependant difficile à établir car dans cette souris le niveau de transcription de CD3δ et de CD3γ est sévèrement diminué. Ce défaut est lié à l'insertion de la cassette neo puisque l'introduction d'un transgène CD3ε dans ces souris ne parvient pas à restaurer la transcription des gènes CD3δ et γ. De plus dans un autre modèle le retrait de la cassette neo grâce au système de recombinaison cre/loxP a permis à DeJarnette et al de montrer que l'inactivation de CD3ε n'influe pas sur la transcription des gènes CD3δ et γ. Cette souris CD3ε^{-/-} présente les mêmes défauts de différenciation que la souris CD3ε^{Δ5/Δ5} (DeJarnette et al., 1998). Chez la souris CD3ε^{Δ5/Δ5} les transcrits TCRB, TCRD et TCRG sont détectables mais aucun transcrit TCRA n'a été mis en évidence (Gallagher et al., 1998; Malissen et al., 1995). Quelques gènes TCRA sont pourtant réarrangés (Mancini et al., 2001).

CD3δ

En absence de chaîne CD3δ, la progression de la différenciation des thymocytes αβ est normale jusqu'au stade DP. Le développement des thymocytes γδ et l'expression du TCRγδ ne sont absolument pas modifiés. La chaîne CD3δ n'est pas nécessaire à la fonctionnalité du pré-TCR. Par contre sa présence est importante pour l'expression d'un TCRαβ mature (Dave et al., 1997).

CD3γ

Les souris CD3γ^{-/-} présentent un blocage drastique de la différenciation des thymocytes au stade DN3 et la cellularité thymique est diminuée d'un facteur 100. On retrouve cependant quelques thymocytes DP et des LT αβ périphériques représentant entre 2 et 5% du nombre normal de lymphocyte. La différenciation des LT γδ n'est pas modifiée. Par

contre l'expression du TCR et de CD3 ϵ en surface est diminuée entre 10 et 20 fois aussi bien dans les lymphocytes $\alpha\beta$ que $\gamma\delta$ (Haks et al., 1998). CD3 γ est donc essentiel à l'assemblage et à l'expression du pré-TCR et du TCR. Son absence perturbe la sélection β ainsi que la sélection négative et positive. Il semble cependant que CD3 δ soit capable de la remplacer partiellement au sein des complexes pré-TCR et TCR puisque les souris CD3 γ x CD3 δ présentent un arrêt total des thymocytes au stade DN3. Dans ces souris il n'y a plus de transcrits TCRB et TCRA et les LT $\gamma\delta$ sont indétectables même au niveau des IEL (Wang et al., 1998). De façon intéressante, le complexe CD3 semble donc aussi jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes TCR puisque la suppression simultanée des chaînes γ et δ empêche la transcription des gènes TCRB et TCRG.

On peut enfin noter que si CD3 δ et CD3 γ développent des fonctions partiellement redondantes, CD3 γ est plus important pour l'assemblage du pré-TCR.

CD3 ζ

L'inactivation du gène CD3 ζ/η entraîne une cellularité thymique réduite, un blocage partiel à la transition DN/DP et au stade DP. Les réarrangements TCRB et TCRA sont normaux cependant peu de thymocytes SP CD4⁺ ou CD8⁺ sont retrouvés et ils n'expriment pas de complexe CD3 en surface. La diminution de la cellularité peut s'expliquer par le rôle du complexe CD3 dans la survie des thymocytes DP lors de la sélection positive (Malissen et al., 1993). L'introduction d'un transgène CD3 ζ sans domaine intracellulaire dans une souris CD3 $\zeta^{-/-}$ restaure presque complètement la prolifération des thymocytes (Shores et al., 1997). Les ITAM de la chaîne CD3 ζ ne sont que partiellement nécessaires à sa fonction. CD3 ζ possède surtout un rôle de structuration du pré-TCR.

1.3. La transduction du signal

La signalisation est initiée par la phosphorylation des motifs ITAM par Lck et Fyn, des protéines tyrosine-kinases (PTK) de la famille Src. Pour pouvoir agir Lck est recrutée à proximité du TCR par association à CD4 ou CD8. La phosphorylation des ITAM provoque le recrutement de Syk et de ZAP70 qui sont constitutivement associées à CD3 ζ lorsque le LT est au repos. Tandis que Syk s'autophosphoryle pour être active, l'activation de ZAP70 par des PTK lui permet d'activer LAT (linker for activation of T cells) par phosphorylation. LAT est un intégrateur moléculaire qui va initier l'activation de différentes voies de signalisation en réponse à l'activation du TCR (Figure 3).

1.3.1. Motifs ITAM

Ce domaine d'activation est composé de 2 séquences peptidiques YxxL/I séparées par 8 AA (Wegener et al., 1992). Les résidus tyrosines et leucines sont indispensables à son activité. On retrouve un domaine ITAM sur la partie intracytoplasmique des chaînes CD3 γ , δ et ϵ mais trois copies sur les sous-unités CD3 ζ (Isakov, 1998). Ces motifs sont redondants car aucun n'est indispensable à la fonction du TCR. Ils vont participer à la transduction du signal en recrutant différentes protéines.

1.3.2. Lck, Fyn

Ce sont des PTK de la famille Src possédant un domaine tyrosine kinase, un domaine d'homologie SH2 (Sarc Homologie 2) et un domaine SH3. Elles contiennent en plus un site de myristilation permettant leur relocalisation à la membrane. Ces deux protéines sont impliquées directement dans la phosphorylation des ITAM des chaînes CD3. Fyn est directement associée au TCR dans les radeaux lipidiques. Lck est retrouvée majoritairement associée à CD4 et CD8. Lors de la reconnaissance d'un complexe CMH/peptide, les corécepteurs CD4 ou CD8 s'associent au TCR amenant Lck à proximité du TCR, provoquant son activation par la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM. Le niveau de phosphorylation des ITAM de CD3 ϵ et CD3 ζ est fortement diminué dans une lignée cellulaire n'exprimant pas Lck. Les souris inactivées pour Lck présentent aussi un blocage partiel de la différenciation au stade DN3, due à un signal pré-TCR altéré. L'activité de Fyn compense probablement partiellement la perte de Lck (Groves et al., 1996; van Oers et al., 1996).

1.3.3. ZAP70, Syk

ZAP70 est une PTK présente dans le cytoplasme. Lors de l'activation du TCR, elle est relocalisée à la membrane et s'associe aux motifs ITAM des chaînes CD3 phosphorylés par Lck grâce à ses deux domaines SH2 (Sloan-Lancaster et al., 1997). ZAP70 est activée par phosphorylation par les protéines Lck et Fyn et va à son tour phosphoryler de nombreuses cibles (LAT, SLP76, PLC γ 1). Lck étant associé aux co-récepteurs CD4 et CD8, la phosphorylation de ZAP70 nécessite donc l'activation des co-recepteurs en plus de celle du TCR (Iwashima et al., 1994). Les ITAM phosphorylés recrutent également la PTK Syk. Syk et ZAP-70 jouent un rôle redondant dans la signalisation à partir du TCR. Ce pourrait être un moyen d'amplifier la réponse cellulaire.

Chez la souris *ZAP70^{-/-}* la différenciation est bloquée au stade DP du fait d'un défaut de signalisation par le TCR. Le développement des souris *syk^{-/-}* n'est pas perturbé mais l'inactivation de *ZAP70* et de *syk* provoque un blocage de la maturation thymocytaire au stade DN3 démontrant un rôle redondant de ces deux protéines dans la signalisation pré-TCR (Cheng et al., 1997).

1.3.4. LAT, SLP76, Gads et autres protéines adaptatrices.

LAT est une molécule adaptatrice fixée à la membrane. Sa partie cytoplasmique comporte 9 résidus tyrosine dont 6 peuvent être phosphorylés par *ZAP70*. Ils servent alors de site de fixation pour les domaines SH2 de plusieurs protéines. Ces protéines sont le plus souvent des molécules adaptatrices telle que Grb2, PLC γ 1, mais aussi à des PTK comme *ZAP70*. LAT est donc un intégrateur de signaux et initie ainsi des voies majeures de signalisation (Figure 3):

La voie des MAP Kinases par recrutement des adaptateurs moléculaires Grb2 et Shc. Grb2 est dépourvue de toute activité enzymatique intrinsèque mais recrute, par le biais de son domaine SH3, Sos qui active à son tour une petite protéine G membranaire Ras. Ras promeut à son tour un signal intra cellulaire transitant par les MAP Kinase et conduisant à l'activation de multiples gènes (Schlessinger, 1993)

La voie calcium-calcineurine dépendante : PLC γ 1 activée par *ZAP70* s'associe au domaine SH2 phosphorylé de LAT et hydrolyse le PIP2 (Phosphatidyl Inositol biPhosphate) en IP3 (Inositol TriPhosphate) et en DAG (diacyl-glycérol) provoquant une augmentation de calcium intra cellulaire et l'activation de la PKC (Protéine Kinase C). Les différentes isoformes de PKC sont notamment impliquées dans l'activation des facteurs de transcription NF-AT, NF-kB et AP-1. La PTK Itk une fois associée à SLP76 sous forme phosphorylée est aussi impliquée dans l'activation de PLC γ 1 (Su et al., 1999).

SLP76 (Sh2 domain containing leukocyte phospho protein of 76 kDa) est une autre molécule adaptatrice intégrée à différentes voies de signalisation régulant les flux calciques. Elle est constitutivement associée par l'intermédiaire de domaines SH3 à Gads (Grb2-like adapter) et peut s'associer à un facteur d'échange de guanine: vav après phosphorylation par *ZAP70* (Liu et al., 1999). Gads permet le recrutement de SLP76 et des Itk associées du cytosol à la membrane grâce à son association inductible avec des résidus tyrosine phosphorylés de LAT. L'absence de LAT empêche par ailleurs toute phosphorylation de vav qui est impliqué dans le contrôle de la transcription du gène de d'IL2.

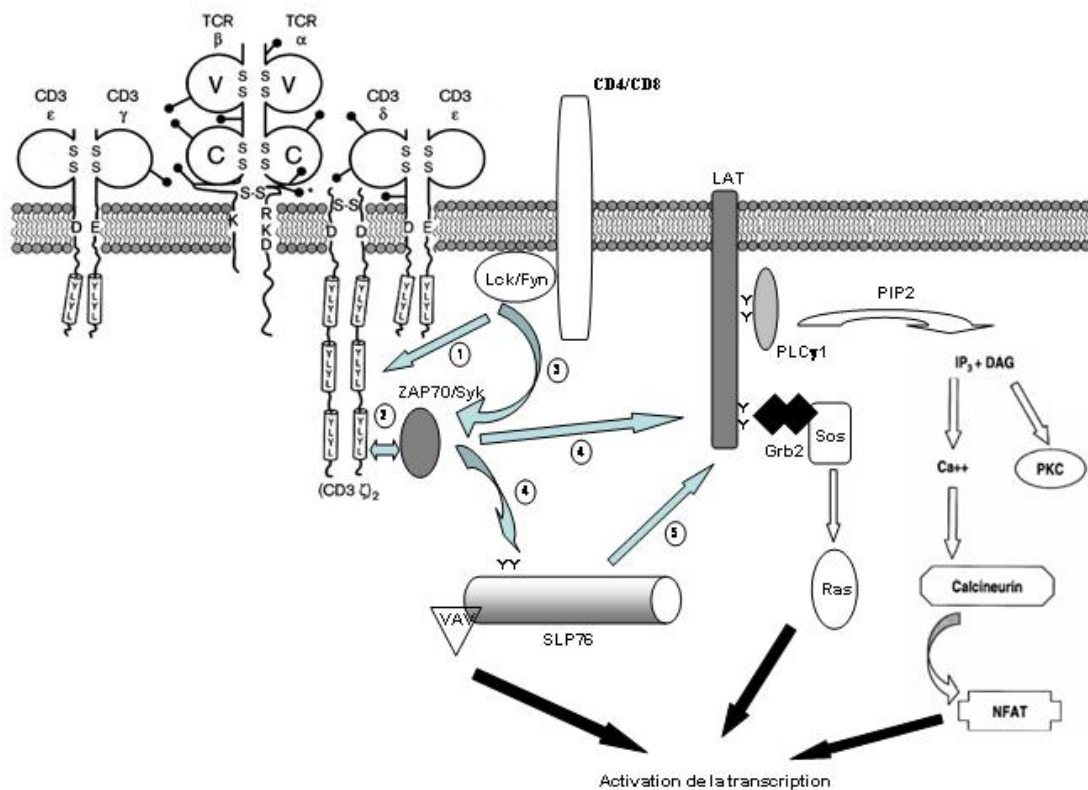


Figure 3 : La signalisation TCR. Les différentes étapes suivant l'engagement du TCR sont indiquées par des flèches numérotées. Les PTK de la famille Src (Lck et Fyn) phosphorylent les ITAM des chaînes CD3. Ces ITAM recrutent les PTK Syk et ZAP70 qui une fois activées vont phosphoryler SLP76 et LAT. LAT et SLP76 intègrent la réponse et initient les voies de signalisation calcium/calcalcineurine dépendante, la voie des Map-Kinase et la voie VAV dépendante. Ces trois voies contrôlent l'activation de la transcription en réponse à l'interaction TCR/CMH/peptide. Figure adaptée d'après Norian et Koretzky 2000

Les rôles clés de SLP76 et LAT dans la signalisation issue du pré-TCR ont été très clairement mis en évidence. Ainsi le développement des thymocytes de souris SLP-76 mutantes est arrêté au stade DN3 malgré la présence de réarrangement TCR β (Clements et al., 1998). Une mutation de LAT au niveau des 4 résidus tyrosine en C term prévient l'association avec Grb2, Gads, la PLC γ 1 et indirectement avec SLP76. Cette mutation provoque un blocage complet du développement des LT $\alpha\beta$ et une forte diminution du nombre de LT $\gamma\delta$. (Sommers et al., 2001). Ce phénotype est identique à celui retrouvé chez les souris LAT $^{-/-}$ (Zhang et al., 1999). Dans les souris mutées uniquement pour les trois dernières tyrosines de LAT, la différenciation des LT $\gamma\delta$ est aussi perturbée quoique de manière moins drastique (Nunez-

Cruz et al., 2003). Le répertoire TCR des LT $\gamma\delta$ est cependant restreint, probablement suite à une expansion polyclonale, et ces cellules présentent un profil de type T_H2 . LAT est donc probablement aussi impliqué dans les processus de régulation homéostatique des LT en périphérie.

1.3.5. Régulation négative

L'activité de signalisation du TCR doit être régulée afin de permettre uniquement aux interactions TCR/CMH-peptide les plus fortes d'aboutir à une réponse cellulaire. Cette régulation participe ainsi à l'établissement d'une tolérance périphérique.

Cette régulation se fait par l'intermédiaire de motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif) qui sont capables de transduire un signal négatif à l'intérieur de la cellule (Revue par (Bolland and Ravetch, 1999). Ce domaine d'inhibition possède une séquence peptidique de type (ILV)_xYXX(LV). Il est retrouvé dans des protéines comme SIT, ICAM-1, la famille des KIR et est phosphorylé sur la tyrosine lors de l'interaction du récepteur qui le porte avec son ligand. Il peut ensuite interagir avec des phosphatases comme SHIP et SHP ou CD45 qui vont déphosphoryler les PTK (Lck, Fyn, ZAP70) ou agir directement sur les motifs ITAM et inhiber la réponse cellulaire due à l'interaction du TCR (Autero et al., 1994; Mustelin et al., 1995).

2. LE REARRANGEMENT DES GENES TCR

En configuration germinale, les gènes codants pour les chaînes du TCR sont morcelés et doivent être réarrangés par un processus de recombinaison somatique dirigée pour pouvoir être exprimés. Ce processus nommé recombinaison V(D)J prend place dans le thymus lors de la maturation des précurseurs lymphocytaires. Il met en jeu un complexe protéique, la recombinase V(D)J, constitué d'enzyme exprimées uniquement dans les lymphocytes et d'enzymes ubiquitaires du système de réparation impliqués dans la réparation par suture des extrémité d'ADN (non homologous end joining, NHEJ). Le mécanisme de la recombinaison est assez bien élucidé même s'il reste encore des facteurs non connus (Dai et al., 2003).

2.1. Organisation des loci TCR

2.1.1. Nomenclature

La nomenclature des gènes TCR utilisée en majorité dans ce manuscrit est celle de WHO-IUS (Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation, 1995). Les gènes codant pour les chaînes TCR α , TCR β , TCR δ et TCR γ sont notés respectivement TCRA, TCRB, TCRD et TCRG. Les loci regroupant les gènes TCRB et TCRG portent le même nom. Le locus regroupant les gènes TCRA et TCRD est dénommé TCRA. Les segments V, D, J et C sont nommés en fonction de cette nomenclature : la lettre désignant la chaîne TCR est suivie de celle désignant le type de gène puis du numéro du gène (ex : AJ1). Les segments V possédant plus de 75% d'identité au niveau nucléotidique sont regroupés au sein d'une même famille. Les différents membres sont identifiés par un numéro précédé d'un S (ADV2S1: membre numéro 1 de la famille ADV2). Cependant, en référence à un travail donné, nous garderons ponctuellement l'utilisation de la nomenclature utilisée dans l'article correspondant.

2.1.2. Locus TCRB

Le locus TCRB est situé sur le chromosome 6 chez la souris et 7 chez l'homme et s'étend respectivement sur environ 700 kilobases (kb) et 600 kb (Figure 4A). Son organisation présente une forte similitude entre les deux espèces, le nombre de segments BV étant cependant sensiblement plus élevé chez l'homme (une soixantaine regroupés en 30 familles contre 34 regroupés eux aussi en 30 familles). Les segments géniques BV sont situés en amont du locus à l'exception de BV14 localisé en orientation de transcription inverse en aval du gène codant pour la région constante BC2. Ce segment ne se réarrange donc pas par

excision comme tous les autres mais par inversion. La jonction signal est alors portée par le chromosome. Les gènes BD au nombre de 2 et BJ au nombre de 14 chez les deux espèces sont regroupés en deux régions successives dupliquées comprenant chacune un gène BD, 6 à 8 gènes BJ et un gène constant BC. Deux des segments BJ et 12 des segments BV chez la souris sont des pseudogènes. Ce nombre est respectivement de 4 et 12 chez l'homme. Chez la souris les gènes BC diffèrent de 4 AA dans la partie C-term sans que des différences de fonctions n'aient été mises en évidence.

Le réarrangement des gènes de ce locus se fait séquentiellement selon un ordre strict. Le réarrangement BD/BJ est d'abord initié au stade DN2/DN3 puis au stade DN3, les gènes BV se réarrangent avec le gène BDJ nouvellement formé.

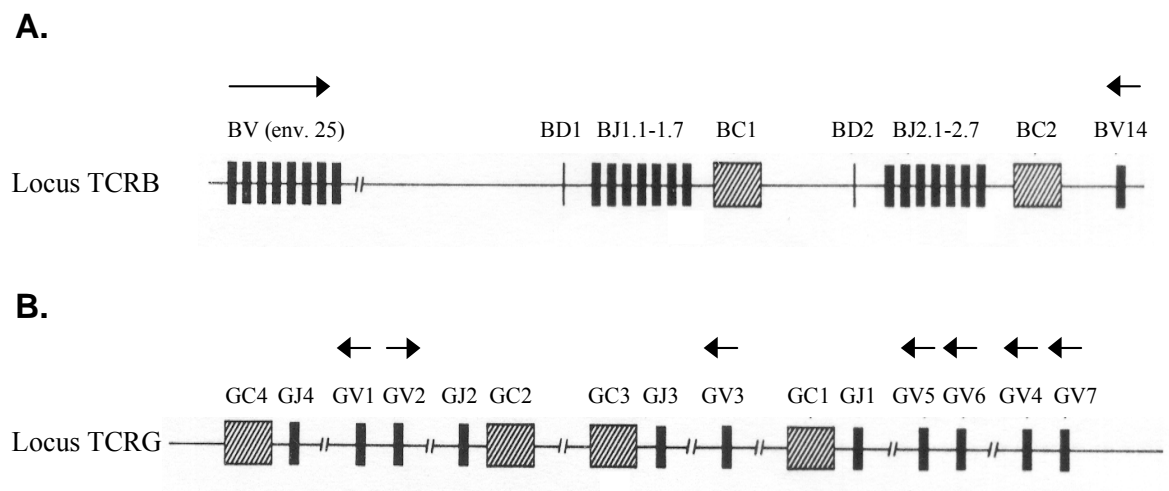


Figure 4 : Organisation des loci TCRB (A) et TCRG (B) murins. Les gènes V, D, J et C sont représentés par des rectangles. L'orientation de transcription des gènes est marquée par les flèches. Les loci ne sont pas représentés à l'échelle. Figure adaptée d'après Kisielow et von Boehmer, 1995.

2.1.3. Locus TCRG

Le locus TCRG situé sur le chromosome 13 chez la souris s'étend sur environ 200 kb (Figure 4B) (Vernooij et al., 1993). Alors que l'organisation du locus humain situé sur le chromosome 7 ressemble à celle du locus TCRB avec une région composée de segments V et deux régions dupliquées possédant chacune plusieurs gènes J et un gène C, les segments TCRG murins sont organisés en quatre régions composées de 1 à 4 gènes GV, d'un gène GJ

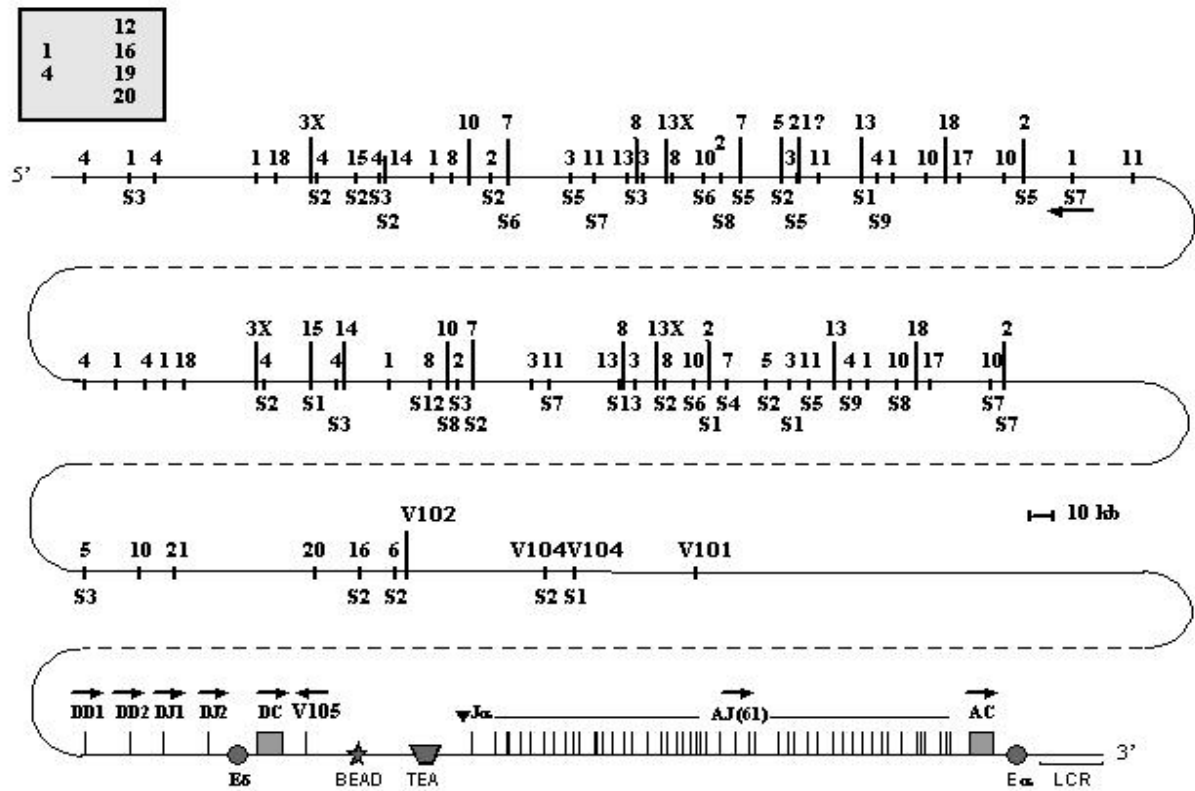
et d'un gène GC. Les gènes GJ3 et GC3 sont des pseudogènes et rendent la région qui les comporte non fonctionnelle.

2.1.4. Locus TCRAD

Le locus TCRAD présente une organisation semblable chez l'homme et la souris. Il est situé sur le chromosome 14 chez les deux espèces et s'étend sur 1 à 1,5 megabase (Dembic et al., 1985). Son organisation unique imbrique les gènes codants pour la chaîne TCR δ entre les gènes TCRAV et TCRAJ codant pour la chaîne α du TCR (Figure 5A et B). Le réarrangement des gènes codants pour la chaîne TCR α interdit de ce fait l'expression d'une chaîne TCR δ .

Les gènes V sont regroupés en amont du locus et la plupart peuvent servir indifféremment à la création de gènes codant pour une chaîne TCR α ou TCR δ (Gallagher et al., 1998; Jouvin-Marche et al., 1998). Certains gènes V annotés DV101 à DV105 ont un usage plutôt restreint à la formation d'une chaîne TCR δ (Gallagher et al., 2001). Chez la souris six gènes DV, 2 gènes DD, 2 gènes DJ et un gène DC ont été identifiés. DV105 comme BV14 est réarrangé par inversion. Les familles ADV sont en majorité multi géniques chez la souris et l'on compte 102 gènes V regroupés en 23 familles dans la lignée 129 / BALB/c. Les membres d'une même famille sont dispersés tout au long du locus et la configuration du locus TCRAD. Le nombre de familles, le nombre de membres dans une famille, et la position des membres varient selon la souche de souris considérée (Jouvin-Marche et al., 1990; Klotz et al., 1989). La région ADV des souris BALB/c comprend deux sous régions ayant probablement été dupliquées au cours de l'évolution. Chez C57BL/6 la région ADV est encore plus complexe puisqu'elle comporte une sous région supplémentaire et certains de ses gènes ADV existent en plusieurs copies identiques rendant la cartographie difficile (Gahery-Segard et al., 1996). Chez l'homme, le locus est moins complexe et l'on compte 54 gènes ADV répartis en 41 familles majoritairement mono géniques. Les segments AJ au nombre de 61 chez les deux espèces sont nommés AJ1 à AJ61, AJ1 étant situé le plus en 3' du locus juste en amont de AC. Certains gènes AJ ne possèdent pas de RSS (Séquence Signal de Recombinaison), de site d'épissage ou de cadre de lecture ouvert correct et sont non fonctionnels. Un certain nombre de ces pseudogènes sont décrits chez l'homme comme chez la souris, mais leur nombre n'est pas défini avec exactitude.

A/



B/

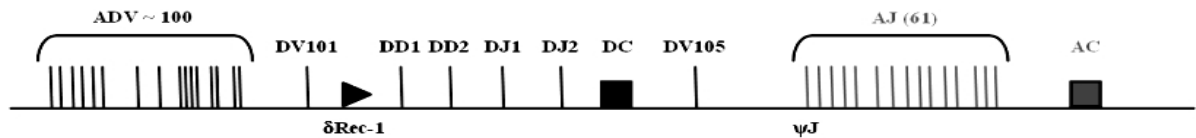


Figure 5 : Organisation génomique du locus TCRAD chez la souris BALB/c. A/ La région ADV représentée sur des lignes complètes est à l'échelle. Pour les parties qui ne sont pas à l'échelle : entre le membre ADV11 localisé en 3' d'ADV7S1 et le membre ADV4 suivant mesure environ 16 kb ; entre ADV2S7 et ADV5S3 mesure environ 21 kb ; la région entre V101 et V105 mesure 66 kb ; la région AJ mesure environ 70 kb. Les segments V, D et J sont représentés par des barres verticales. Les éléments codant les régions constantes sont représentés par des carrés. Les éléments de contrôle des réarrangements sur le locus sont indiqués. Les noms des segments ADV sont indiqués au dessus de la ligne qui représente le locus Les noms des membres sont indiqués, précédés d'un S, au dessous de la ligne. Les flèches indiquent des segments dont l'orientation de transcription est inverse. Le séquençage de l'extrémité 5' du locus n'a pas encore été complété, la boîte grisée contient les noms des familles que l'on sait être présentes dans cette région. La carte a été construite à partir de données publiées (Jouvin-Marche *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1994; Jouvin-Marche *et al.*, 1998) et des séquences déposées dans Genbank (NT_002581). B/ Carte simplifiée du locus TCRAD chez la souris BALB/c sur laquelle ont été positionnés l'élément $\delta\text{Rec-1}$ et ψJ . Les gènes codant pour la chaîne TCR δ sont identifiés par leur nom. Ils se trouvent imbriqués entre les gènes $\delta\text{Rec-1}$ et ψJ

Le réarrangement des gènes TCRD se fait de façon séquentielle mais à la différence du locus TCRB, la première étape peut aussi bien impliquer un gène DV et un gène DD qu'un gène DD et un gène DJ (Chien et al., 1987). Il faut également noter que les deux gènes DD peuvent être utilisés en même temps dans un même réarrangement.

Il existe enfin 3 éléments particuliers chez la souris et 7 chez l'homme nommés « delta deleting element » ou δ Rec (Figure 5B). Ces éléments consistent en une RSS de type 23 sans exon codant attaché. Le réarrangement des gènes δ Rec est donc totalement improductif en terme de protéines. Cependant le réarrangement δ Rec-1/AJ élimine du locus les gènes TCRD et cette caractéristique sera discutée plus loin dans la partie choix du lignage $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$.

2.2. La recombinaison V(D)J

2.2.1. RAG-1 et RAG-2

RAG-1 et RAG-2 (Recombination Activating Gene) (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989) sont deux protéines exprimées conjointement uniquement dans les lymphocytes. RAG-1 est aussi exprimée dans le système nerveux central sans qu'on connaisse son rôle dans ce tissu (Chun et al., 1991). RAG-2 et RAG-1 initient le réarrangement par la reconnaissance de séquences conservées flanquant chaque segment codant. Ces motifs appelés RSS sont constitués d'un heptamère hautement conservé (consensus *cacagtg*) et d'un nonamère de type « *acaaaaacc* » séparés par un espaceur de 12 +/- 1 ou 23 +/- 1 pb. Les variations de taille de l'espaceur ainsi que l'éloignement de l'heptamère de la séquence consensus affectent fortement l'efficacité de la recombinaison (Hesse et al., 1989). La recombinaison n'est efficace *in vivo* qu'entre une RSS 12 et une RSS 23 (règle 12/23) (Tonegawa, 1983). Un « renforcement » de cette règle a récemment été mis en évidence au niveau du locus TCRB et sera discuté dans la partie régulation de la recombinaison.

RAG-1 reconnaît le nonamère grâce à son homéodomaine, se fixe et recrute RAG-2 qui stabilise la liaison à l'ADN en établissant un contact protéine ADN avec l'heptamère et les 3 à 4 pb du segment codant adjacent (Difilippantonio et al., 1996; Spanopoulou et al., 1996). Les deux RSS sont alors ramenées à proximité à l'aide des protéines HMG, formant ainsi une synapse. La recombinase V(D)J introduit une coupure simple brin (van Gent et al., 1995) concertée en 5' de l'heptamère des deux RSS rapprochées. L'OH libre présent en 3' attaque alors le brin opposé par transestérification et génère une extrémité codante en épingle à cheveux (Schlissel et al., 1993). Ce mécanisme d'action et ses spécificités s'apparentent

fortement à celui de transposases. L'extrémité signal terminée par la RSS est franche et phosphorylée. Selon la littérature, la JS est formée par la ligation parfaite des deux extrémités franches (Alt and Baltimore, 1982; Lewis et al., 1985). Lors de la recombinaison par excision la JS est portée par un cercle d'excision (TREC) qui comprend la portion d'ADN initialement située entre les deux gènes ayant réarrangés (Figure 6). La formation de la jonction codante (JC) nécessite un apprêtement des extrémités codantes avant la ligation. Ces étapes mettent à contribution les protéines du NHEJ.

In vitro cette première étape de coupure ne nécessite que la partie core des RAGs définie comme la partie minimum nécessaire à l'obtention de la coupure d'ADN. L'influence des cations divalents employés *in vitro* est cependant primordiale. En présence de Mg^{2+} , « l'ion physiologique », la coupure est concertée et respecte la règle 12/23. Sa précision varie selon que l'on emploie des protéines RAGs entières ou non. En présence de Mn^{2+} , une coupure double brin au niveau d'une RSS isolée peut être obtenue. La recombinaison entre deux RSS 12 ou deux RSS 23 est aussi possible. Les protéines HMG sont surtout nécessaires *in vivo* et augmentent l'efficacité de la recombinaison.

Ces protéines sont indispensables à la recombinaison V(D)J puisque la délétion des gènes RAG-1 ou RAG-2 aboutit à un blocage de la différenciation au stade DN3 et à une absence totale de réarrangement (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). Si l'irradiation est capable de restaurer la différenciation des thymocytes de RAG-2^{-/-} jusqu'au stade DP, cette maturation ne s'accompagne pas du réarrangement des gènes TCRB ou TCRA (Zuniga-Pflucker et al., 1994).

2.2.2. Le complexe DNA-PK

Ce complexe a été identifié par son activité kinase stimulée spécifiquement par des extrémités d'ADN double brin (Walker et al., 1985). Il est composé de trois sous unités : la sous unité catalytique DNA-PKcs, Ku70 et Ku80. DNA-PK est un composant majeur de la réparation des cassures double brin (DSB) par NHEJ. L'activité kinase de DNA-PK est élevée durant la phase G1 du cycle cellulaire et plutôt faible en phase S (Lee et al., 1997) ce qui est compatible avec son implication dans la recombinaison. Lors de la recombinaison V(D)J, Ku détecte le changement de conformation de l'ADN dû aux DSB introduites par la recombinase et est activé. Cette activation dévoile une séquence de 12 AA en C-terminal de Ku80 qui sert à recruter DNA-PKcs. Le complexe stabilise son interaction avec l'ADN et DNA-PKcs participe au rapprochement des extrémités d'ADN dans un complexe synaptique à deux molécules de DNA-PKcs afin de faciliter la ligation (Weterings et al., 2003). En plus de

son rôle de détection des altérations de l'ADN, l'autre fonction majeure de DNA-PK consiste à recruter et activer d'autres protéines de réparation de l'ADN (XRCC4, DNA Ligase IV) qui vont participer à la formation des JC et des JS (Calsou et al., 2003; Nick McElhinny et al., 2000).

DNA-PKcs possède l'activité catalytique du complexe. C'est une S/T kinase nucléaire de 470 kD qui se fixe à l'ADN par un canal ouvert. Elle phosphoryle préférentiellement les motifs S/T-Q. Son domaine kinase de type PI3K est localisé dans sa partie C-terminale tandis que le centre de la protéine présente un cluster de 6 résidus thréonine phosphorylables dont 3 sont fortement conservés au cours de l'évolution (thréonine 2609, 2638, 2647). D.W Chan et al ont démontré que DNA-PKcs était capable de s'autophosphoryler très rapidement sur sa thréonine 2609 suite à un stress radiatif (Chan et al., 2002). Une mutation de cette thréonine en alanine provoquant une augmentation de sensibilité aux radiations et une diminution de l'efficacité de la réparation des DSB. Cette phosphorylation est transitoire. L'inactivation de DNA-PK est assurée par des phosphatases comme la protéine phosphatase 5 dont la surexpression diminue la phosphorylation de DNA-PKcs suite à une irradiation.

Les souris SCID présentent un blocage de la différenciation des thymocytes au stade DN3 lié à un défaut d'activité kinase de DNA-PKcs (Blunt et al., 1996). L'analyse de la recombinaison chez ces souris a révélé une accumulation d'extrémités codantes non résolues, suggérant un rôle pour DNA-PK dans l'ouverture de l'épingle à cheveux (Roth et al., 1992; Zhu and Roth, 1995). Quelques jonctions codantes, environ 1000 fois moins que dans les souris sauvages, sont cependant détectables (Kurimasa et al., 1999). Les JC formées à partir de substrats de recombinaison dans des lignées cellulaires SCID présentent des délétions importantes et une fréquence élevée de micro homologie au niveau des extrémités codantes (Blunt et al., 1995; Brown and Chang, 2000). L'efficacité de formation des JS est diminuée d'un facteur 10 environ. La résolution des extrémités signal obtenues à partir de substrats de recombinaison est infidèle et les JS comme les JC présentent une fréquence élevée de modification par délétion (Schuler et al., 1986). Cette perte de nucléotide est cependant beaucoup moins fréquente dans les JS amplifiées à partir de thymocytes de souris SCID (Blackwell et al., 1989) et ne provient pas d'une coupure initiale imprécise (Zhu and Roth, 1995). En contradiction avec l'étude de Blackwell et al, le séquençage des JS effectué par Bogue et al ne fait pas apparaître d'augmentation de l'incidence des délétions (Bogue et al., 1997). L'impact de la perte d'activité kinase de DNA-PKcs sur la fidélité des JS n'est donc pas formellement établi. On a soupçonné l'activité kinase résiduelle de DNA-PKcs présente dans les souris SCID (Danska et al., 1996) de participer à la formation des JC. Cependant les

JC sont encore détectables dans les souris DNA-PKcs^{-/-} (Gao et al., 1998). L'absence totale de thymocyte DP, SP et de LT périphériques est la seule différence notable de phénotype entre ces deux souris. Taccioli et al ont aussi généré une souris exprimant une protéine DNA-PKcs dépourvue de toute activité catalytique (Taccioli et al., 1998). De façon surprenante dans cette souris, les thymocytes DP représentent 90% des thymocytes alors qu'ils sont absents dans la souris DNA-PKcs^{-/-} générée par Gao et al. Quelques JC sont détectables et le niveau de JS est normal. Ces JS sont d'autre part moins modifiées que dans les souris SCID. Le rôle exact de DNA-PKcs dans la formation des JS reste donc à déterminer.

Ku70 et Ku80 forment un hétérodimère qui lie l'ADN de manière séquence indépendante, formant un anneau avec un canal central qui transloque autour de l'ADN grâce à leur activité hélicase. Les souris mutées pour Ku80 et Ku70 présentent non seulement une accumulation d'extrémités codantes fermées covalamment mais en plus une forte diminution de la quantité des JS. Consécutivement au fait que les JS et les JC présentent de grosses délétions et des régions de microhomologie (Gu et al., 1997), il a été suggéré un rôle de l'hétérodimère Ku dans l'alignement des extrémité d'ADN facilitant la ligation en absence d'homologies de séquence. Ces souris présentent aussi un défaut de croissance et une sensibilité élevée aux radiations (Gao et al., 1998).

La différence de phénotype observée entre les souris Ku^{-/-} ou DNA-PKcs nulle suggère un rôle pour Ku80 et Ku70 dans la réparation de l'ADN et la recombinaison indépendamment de DNA-PKcs.

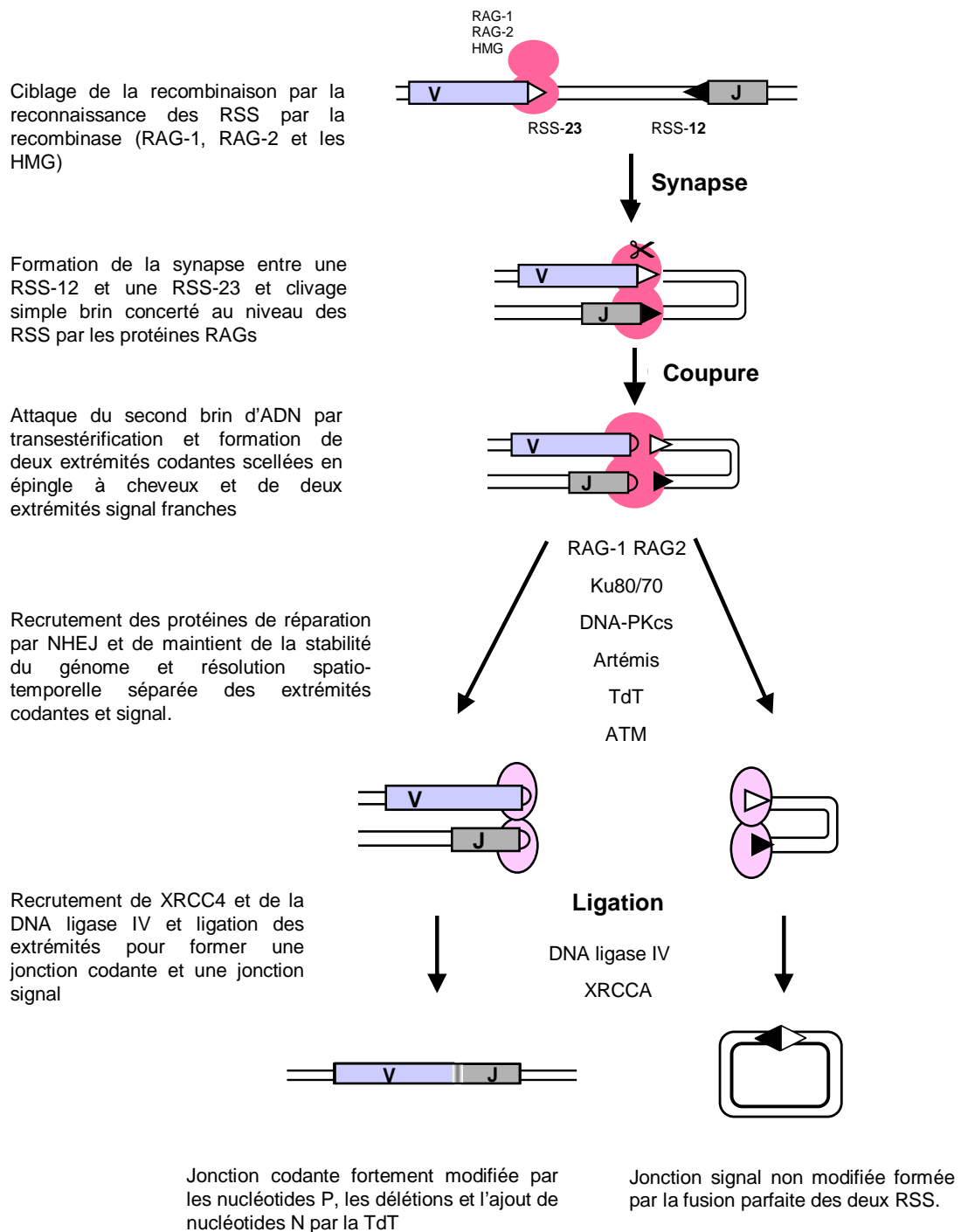


Figure 6 : Mécanisme de la recombinaison V(D)J. Ce schéma résume les principales étapes de la recombinaison entre un gène V et un gène J. Les gènes sont indiqués par des rectangles et les RSS par des triangles blancs (RSS 23) et noir (RSS 12). Les protéines impliquées dans la résolution des extrémités codantes et signal sont indiquées entre les deux flèches divergentes. Adapté de (Krangel, 2003).

2.2.3. Artemis

Artémis est une protéine qui a été découverte récemment du fait de sa mutation chez les patients RS-Scid (Severe radio-sensitivity SCID) (Moshous et al., 2001). Les fibroblastes de ces patients présentent une hypersensibilité aux radiations ionisantes et un défaut de la recombinaison V(D)J affectant uniquement la formation des JC. Ce phénotype s'apparente à celui retrouvé chez les souris SCID, l'activité de DNA-PK est cependant normale (Nicolas et al., 1996; Nicolas et al., 1998). Ces symptômes associés au fait qu'Artemis appartienne à une famille de protéines catalysant l'hydrolyse de liaison covalente, les β lactamases, a laissé entrevoir la possibilité que cette protéine puisse intervenir dans l'ouverture de l'épingle à cheveu présente au niveau des extrémités codantes. L'étude de Ma et al a clairement montré que *in vitro* DNA-PKcs forme un complexe avec Artémis et catalyse sa phosphorylation (Ma et al., 2002). Alors que Artémis seule possède uniquement une activité exonucléase 5'→3' sur de l'ADN simple brin, le complexe Artemis/DNA-PKcs indépendamment de Ku acquiert une activité endonucléase qui permet l'ouverture de l'épingle à cheveu. Cette activité régulée par DNA-PKcs nécessite en plus de la phosphorylation d'Artémis la présence physique de DNA-PKcs. Il semble enfin que l'ouverture se fasse de façon asymétrique à en moyenne 2 à 3 pb en 3' de l'apex de façon similaire à ce que l'on retrouve *in vivo* au niveau des extrémités codantes de gènes d'Ig (Schlissel, 1998). La nécessité de la phosphorylation d'Artémis par DNA-PKcs pour la recombinaison V(D)J et cependant remise en cause par l'étude de Poinssignon qui montre une complémentation efficace de cellules déficientes pour la recombinaison par une protéine Artémis mutée sur ses sites de phosphorylation S/T-Q. D'autre part la phosphorylation basale et la phosphorylation en réponse à un stress radiatif d'Artémis semblent se faire indépendamment de DNA-PKcs (Poinssignon et al., 2004).

La démonstration du rôle primordial d'Artémis dans la résolution des extrémités codantes a été renforcée par la production de souris déficientes pour Artémis (Rooney et al., 2003). Ces animaux présentent un blocage du développement lymphocytaire et une accumulation d'extrémités codantes fermées en épingle à cheveux est retrouvée dans les thymocytes immatures. Quelques JC caractérisées par une augmentation de la taille et de la fréquence des nucléotides P, de larges délétions, (Rooney et al., 2003) ainsi que quelques lymphocytes T CD4⁺ sont retrouvés chez ces souris suggérant l'existence d'autre(s) protéine(s) capable(s) d'ouvrir, avec cependant une très faible efficacité, la structure en épingle à cheveux formée par les protéines RAG. Ces mêmes protéines pourraient aussi expliquer la formation des JC chez les souris SCID.

2.2.4. Le complexe XRCC4 -DNA Ligase IV

Ce complexe est impliqué dans l'étape de réparation des DSB induites par l'action de la recombinaise. La complémentation d'une lignée de cellules XR1 déficiente pour la recombinaison *in vitro* par une banque de cDNA a permis la découverte du gène XRCC4 qui code une protéine de 326 AA chez la souris et 334 chez l'homme. Dans les cellules XR1 l'expression transitoire de RAG-1 et RAG-2 permet la coupure double brin de substrats de recombinaison artificiels mais la formation des JC et des JS est fortement perturbée suggérant un rôle de XRCC4 dans l'étape de réparation de la cassure double brin (Li et al., 1995). XRCC4 semble agir en stabilisant l'expression de la DNA-Ligase IV. La stimulation de l'activité de la ligase par XRCC4 est par contre sujette à controverse (Grawunder et al., 1997; Modesti et al., 1999). Le recrutement du complexe au niveau des extrémités d'ADN semble assuré par Ku (Nick McElhinny et al., 2000), l'interaction et la phosphorylation de XRCC4 par DNA-PKcs étant dispensable (Mizuta et al., 1997). En plus de leur implication dans la recombinaison V(D)J, la mortalité embryonnaire liée à la délétion de l'un ou l'autre des partenaires de ce complexe démontre leur importance dans la réparation par NHEJ.

2.3. Diversité du répertoire TCR

Le répertoire est l'ensemble des TCR de spécificités antigéniques différentes portées par les lymphocytes T périphériques. La diversité du répertoire des TCR résulte de trois mécanismes principaux : la diversité combinatoire, la diversité jonctionnelle et la diversité d'appariement des deux chaînes clonotypiques formant le TCR. Ces mécanismes sont nécessaires à l'établissement d'un répertoire suffisamment large pour reconnaître un nombre virtuellement illimité d'antigènes. En l'absence de la diversité jonctionnelle, le nombre de segments géniques nécessaires à l'établissement d'un répertoire équivalent serait probablement trop élevé pour pouvoir être contenu dans le génome.

2.3.1. Diversité combinatoire

2.3.1.1. Combinaison des gènes V(D)J

La première source de diversité découle du principe même de la recombinaison V(D)J. Son degré de diversité dépend du nombre de combinaisons possibles lors de l'assemblage des segments V, D et J présents sur le locus. Statistiquement, plus le nombre de segments est élevé et plus la diversité combinatoire est haute. Cependant, la combinaison de gènes utilisée pour former une chaîne TCR n'est pas totalement aléatoire. L'utilisation des gènes est en effet soumise à une régulation spatio-temporelle au cours de l'ontogénie et même

à l'âge adulte certaines combinaisons ne sont pas détectables bien qu'elles soient théoriquement possibles selon la règle 12/23.

Au cours de l'ontogénie, la cinétique d'utilisation des gènes V, D et J est extrêmement contrôlée puisqu'elle est valable pour n'importe quelle souris consanguine. Les réarrangements des gènes TCRB, TCRD et TCRG sont détectables à partir du 14^{ème} jour fœtal (F14). Les réarrangements TCRA apparaissent plus tardivement au jour F16. Au cours du développement, des changements dans la distribution des gènes utilisés ont été constatés. Chez les LT $\gamma\delta$, les segments géniques GV3 et GV4 sont préférentiellement utilisés chez le fœtus en combinaison avec DV101 alors que chez l'adulte ce sont les segment GV2 et GV5 combinés à DV105 (Havran and Allison, 1988; Iwashima et al., 1988). Les premières cellules $\gamma\delta$ formées pendant la gestation présentent des récepteurs invariants en partie explicables par l'absence d'expression de la terminal desoxynucléotidyl transférase (TdT) à ce stade (Lafaille et al., 1989). Les cellules exprimant le récepteur invariant GV3/DV101 migrent vers l'épiderme tandis que celle exprimant le récepteur GV4/DV101 colonisent l'épithélium des organes reproducteurs. Chez l'adulte les jonctions sont variées du fait de l'addition de nucléotides N. L'analyse des transcrits au niveau du locus TCRAD par RT-PCR montre aussi une utilisation majoritaire de DV101 à F18 pour former une chaîne α , alors que sa présence n'est plus détectable dans le répertoire adulte (Gallagher et al., 2001). Un phénomène identique est bien caractérisé au niveau du locus delta où l'utilisation de DJ1 est abandonnée au profit de DJ2 après la naissance.

L'analyse de l'utilisation des gènes ADV et AJ au niveau génomique, montre clairement une ouverture concentrique du locus TCRAD (Pasqual et al., 2002). Les segments AJ proximaux sont les premiers utilisés en combinaison avec les gènes ADV les plus proximaux (3'). Ce n'est qu'à partir de la naissance que le locus est totalement accessible comme le montre l'étude des réarrangements utilisant les membres de la famille ADV2. Il n'en reste pas moins que la distance de positionnement d'un gène ADV influe sur les segments AJ qu'il utilise préférentiellement (Jouvin-Marche et al., 1998; Pasqual et al., 2002; Thompson et al., 1990). Il est intéressant de noter que le jour 16 fœtal marque un point particulier dans l'utilisation du locus ADV. A ce stade, les régions ADV et AJ sont complètement ouvertes et les segments sont utilisés indépendamment de leur localisation, en contradiction avec le modèle d'ouverture concentrique (Jouvin-Marche et al., 1998). Il semble que ce soit la production des premiers thymocytes DP entre F16 et F18 qui provoque la mise en place de la restriction d'accessibilité des locus observée aux stades ultérieurs de

développement. D'autre part les études de Rytkenon et al ont mis en évidence des hot-spots (HS) de recombinaison au niveau de la région AJ. Le HS1 englobe les segments AJ61 à AJ48 et les HS2 les segments AJ31 à AJ22. Leurs résultats montrent aussi une utilisation préférentielle du HS1 pendant l'ontogénie, analyse confirmée par l'étude des transcrits TCRA au cours du développement (Jouvin-Marche et al., 1998; Mancini et al., 1999).

Tous ces résultats suggèrent donc que la taille du répertoire obtenue par la diversité combinatoire est bien inférieure à celle calculable en supposant une utilisation aléatoire des gènes V, (D) et J.

2.3.1.2. Appariement des chaînes TCR

Cette diversité est liée aux différentes possibilités d'appariement d'une chaîne α ou γ avec une chaîne β ou δ . Ce mécanisme est très peu décrit dans la littérature. L'analyse par single cell PCR a permis de montrer que des lymphocytes T partageant une même chaîne TCR β exprimaient des chaînes TCRA différentes (Hamrouni et al., 2003). Cette étude étant réalisée suite à une immunisation, et les clones triés en utilisant un tétramère, les TCR étudiés sont tous spécifiques du même antigène. Par conséquent en absence de sélection antigénique, la diversité combinatoire d'appariement d'une chaîne TCR β pourrait être beaucoup plus élevée que ce que laisse apparaître cette étude. Une chaîne TCR β peut donc s'apparier avec différentes chaînes TCR α . On peut cependant envisager que toutes les combinaisons ne sont pas possibles, des problèmes allostériques ou de charge des AA notamment au niveau de la région CDR3 pouvant empêcher l'appariement. Il a ainsi été montré que les chaînes TCR β sélectionnées comportent préférentiellement des AA chargés et polaires. Les CDR3 comportant des résidus hydrophobes semblent être contre sélectionnés (Candeias et al., 1991). Si le répertoire reste globalement inchangé suite à la sélection β (Wilson et al., 1988) des biais dans les gènes utilisés suite aux processus de sélection positive et/ou négative apparaissent (Candeias et al., 1991). Le TCR formé est aussi soumis à un processus de sélection qui élimine les combinaisons de chaînes trop ou pas assez efficaces (voir la partie développement thymique) dans la reconnaissance du soi ce qui diminue la diversité d'appariement.

2.3.2. Imprécision de jonction

La diversité jonctionnelle est à l'origine de la plus grande part de la diversité du TCR. Trois types de modifications sont fréquemment retrouvées : les nucléotides palindromiques, les délétions, et les addition de nucléotides N. Cette diversité peut être mise en évidence par le séquençage de la région hypervariable CDR3. Une autre technique appelée immunoscope permet grâce à une simple réaction de PCR de visualiser la diversité des jonctions créées, dans une population de thymocytes, par le réarrangement de deux ou trois segments donnés (Pannetier et al., 1993).

2.3.2.1. Nucléotides Palindromiques

Lors de l'initiation du réarrangement des gènes TCR, les extrémités codantes sont scellées en épingle à cheveux. L'ouverture de cette épingle à cheveux par Artémis grâce à son activité endonucléasique peut se faire de manière asymétrique, générant une extrémité cohésive (Schlissel, 1998). Le brin portant l'extrémité sortante possède alors une séquence nucléotidique palindromique. Les nucléotides ainsi « ajoutés » sont nommés nucléotides P (Lafaille et al., 1989). Ces modifications nécessitent une coupure simple brin de l'épingle à cheveu. L'utilisation de substrats de recombinaison artificiels a permis de montrer que la séquence des extrémités codantes affecte fortement la résolution des extrémités codantes. Une variation d'un nucléotide suffit à changer la fréquence des nucléotides P (Nadel and Feeney, 1997).

2.3.2.2. Délétions

Des délétions de la partie codante des gènes TCR sont fréquemment retrouvées lors de l'analyse des jonctions codantes. Une fois l'épingle à cheveux ouverte, les extrémités codantes peuvent être modifiées par l'action d'une exonucléase encore non identifiée à ce jour. Artémis non appariée à DNA-PKcs pourrait peut être jouer un rôle dans ce processus puisqu'elle possède alors *in vitro* une activité exonucléasique sur de l'ADN simple brin. Elle pourrait également couper l'épingle à cheveux sur les deux brins et libérer son apex en générant une délétion. Cependant encore aucune preuve de son implication *in vivo* n'a pu être apportée. Comme pour les nucléotides P, la séquence des extrémités codantes influence l'étendue et la fréquence des délétions. L'étude de Nadel et al montre ainsi que les séquences des extrémités codantes constituées de GC représentent une région défavorable au processing. La présence d'un tri nucléotide TAT, TGT ou ATA interrompant cette succession de G et de C marque par contre un site de « coupure » privilégié (Nadel and Feeney, 1997).

2.3.2.3. Nucléotides N

Les nucléotides N sont les nucléotides non codés présents dans la jonction codante dont l'ajout est catalysé de manière aléatoire et indépendamment de toute matrice par la TdT (Kallenbach et al., 1992). En moyenne on retrouve un ajout de 3 pb par jonction dans les chaînes TCR β (Candeias et al., 1991).

L'expression de la TdT est régulée au cours du développement. L'ARNm est détectable 4 jours après la naissance et les nucléotides N apparaissent dans les réarrangements 1 ou 2 jours après (Bogue et al., 1992). Cette régulation a un impact direct sur la diversité du répertoire du fœtus et du nouveau né (Bogue et al., 1991). L'analyse de nombreuses jonctions d'Ig ou de chaîne TCR γ et TCR δ chez le fœtus et le nouveau né révèle l'existence de jonctions majoritaires présentant de courtes séquences homologues entre les deux gènes raboutés. Trois jonctions GV3/GJ1 sont ainsi surreprésentées chez le fœtus. L'étude du réarrangement GV3/GJ1 chez la souris adulte en absence de la TdT fait apparaître un répertoire de type fœtal où ces trois jonctions représentent 60% des jonctions GV3/GJ1 contre 11% chez la souris sauvage (Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993). La diversité est diminuée d'un facteur 10 dans les thymocytes α/β en absence de TdT et la région CDR3 voit sa taille diminuée de 3 pb en moyenne (Cabaniols et al., 2001). L'ensemble de ces résultats démontre un rôle majeur de la TdT dans la diversité du répertoire chez l'adulte et une influence sur le mécanisme utilisé lors du réarrangement des gènes TCR. Son absence du complexe de résolution des cassures de l'ADN générées par les protéines RAGs favorise la recombinaison par homologie (RH). Deux hypothèses sont avancées : la RH utilise de courtes séquences proches des extrémités codantes et l'ajout de nucléotides N par la TdT rend la RH impossible en augmentant la distance entre les séquences homologues. Autre hypothèse, la présence de la TdT empêcherait la fixation des protéines impliquées dans la RH.

Enfin l'épissage alternatif de l'ARNm de la TdT produit une forme courte de 509 AA (TdTS) et une forme longue de 529 AA (TdTTL) (Doyen et al., 1993). La forme longue une fois transfectée reste plutôt localisée dans le cytoplasme où elle est rapidement dégradée. Dans des souris exprimant uniquement cette forme, la TdTTL peut gagner le noyau mais reste incapable de catalyser l'ajout de nucléotides N contrairement à la forme courte. L'étude de Thai démontre que la forme L possède *in vitro* une activité exonucléase et l'on peut supputer son implication dans les modifications par délétion de la jonction codante (Thai et al., 2002). Cependant les travaux de N Doyen, contredisent ces résultats et montrent que les deux

variants de la TdT sont capables de catalyser l'ajout de nucléotide N, la TdTL étant moins efficace. De plus la comparaison des jonctions formées lors de tests de recombinaison *in vitro* en présence soit de la TdTL soit de la TdTS ne parvient pas à mettre en évidence de différences (Doyen et al., 2004). La thermolabilité de l'activité polymérase de la TdTL et éventuellement le recrutement d'une exonucléase spécifique des cellules CHO expliqueraient cette différence de résultats. Il semble à la vue de ces deux études que la diversité du répertoire n'est pas affectée par la TdTL et que son activité polymérase entre en compétition avec sa faible activité exonucléase. *In vivo*, à 37°C, la TdT n'est probablement pas responsable des délétions fréquentes retrouvées dans les jonctions codantes comme l'indique d'ailleurs la fréquence tout à fait normale des délétions dans les jonctions codantes de souris TdT^{-/-}.

2.4. Régulation de la recombinaison

Si la recombinaison V(D)J est un mécanisme essentiel pour assurer la mise en place du système immunitaire, l'introduction de cassures double brin et leur résolution doivent être fortement contrôlées afin de maintenir l'intégrité du génôme et de prévenir des translocations/insertions illégitimes. Plusieurs niveaux de contrôle sont présents et, en cas de défaillance des systèmes de réparation, il est probable que la cellule soit éliminée par apoptose. Les RSS permettent de recruter la machinerie de recombinaison là où elle est nécessaire, au niveau des loci endogènes. Il existe cependant des défaillances dans ce ciblage. Chez des patients atteints de lymphomes, des translocations chromosomiques ont en effet pu être mise en évidence. Ces translocations impliquent souvent un gène Ig ou TCR et un protooncogène. L'étude du point de cassure au niveau du protooncogène a montré que des séquences nucléotidiques appelées RSS cryptiques possédaient une ressemblance avec les RSS. Il s'agirait donc d'une erreur de ciblage de l'activité de la recombinase. Cette possibilité est fortement supportée par l'étude de Marulescu et al qui montre grâce à des substrats artificiels de recombinaison que les RSS cryptiques bordant les protooncogènes impliqués dans plusieurs translocations sont parfaitement fonctionnelles. La fréquence de recombinaison obtenue avec ces RSS cryptique est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec des RSS d'Ig (Marulescu et al., 2002). Les translocations chromosomiques ne sont cependant pas aussi fréquentes. Une certaine proportion n'est probablement pas détectée car sans conséquence pour l'individu. Il existe aussi certainement des mécanismes de régulation qui limitent la translocation *in vivo* comme l'accessibilité aux protooncogènes.

La séquence nucléotidique influe aussi sur l'efficacité de recrutement et de coupure par la recombinaise. Des changements mineurs de nucléotides à certaines positions dans l'héptamère et le nonamère suffisent à faire baisser drastiquement la fréquence de recombinaison. La séquence de l'espaceur affecte aussi cette efficacité (Lee et al., 2003; Nadel et al., 1998). Cependant si la séquence des RSS permet d'expliquer en partie les variations de la fréquence d'utilisation des gènes TCR et Ig, elles ne permettent pas d'expliquer la régulation cellulaire et temporelle spécifique de la recombinaison. Ainsi l'expression de RAG-1 et RAG-2 dans les fibroblastes ne suffit pas à induire le réarrangement des loci Ig ou TCR (Oettinger et al., 1990). Pour que le réarrangement puisse se produire, il faut donc que les gènes dans les loci soient accessibles. La nécessité de la transcription germinale pour l'accessibilité a été la première hypothèse étudiée. Est ensuite apparu le concept de régulation de la structure chromatinienne comme moyen de réguler la transcription et l'accessibilité. Ces concepts dépendent fortement d'un grand nombre d'éléments « cis activateurs » comme les promoteurs des segments V, le TEA, les enhanceurs et le LCR (Figure 7).

L'expression des protéines RAGs, l'accessibilité des loci et la présence d'enhanceurs participent activement à la régulation de la recombinaison.

2.4.1. Régulation de l'expression des gènes et des protéines RAG

Le premier niveau de régulation relève du contrôle de l'expression tissulaire des gènes codant pour les protéines RAGs. Ces deux gènes sont contigus chez toutes les espèces analysées et orientés en sens inverse de transcription. Cette disposition particulière et leur capacité à catalyser la transposition *in vitro* suggère fortement une évolution à partir d'un élément transposable (Agrawal et al., 1998). Deux régions distinctes situées en 5' de RAG-2 et s'étendant sur 9 kb restreignent l'expression de RAG-1 et RAG-2 aux lymphocytes B et T (Yu et al., 1999). Dans les LB, RAG-2 est sous le contrôle de la région située entre 2 et 7 kb tandis que c'est la zone entre 7 et 9 kb qui est nécessaire à son expression dans les LT (Monroe et al., 1999a). Un enhanceur du locus RAG nommé D3 a été décrit. Il n'est accessible à la DNase que dans les lymphocytes et contient des sites de liaison à des facteurs de transcription lymphoïdes comme E2A, MYB, RUNX1 et LYF1 (Wei et al., 2002). Le réarrangement est donc limité aux seuls lymphocytes par ces éléments de régulation. En plus de cette spécificité tissulaire, la transcription des gènes est régulée au cours de la différenciation des thymocytes. Le niveau de transcription est élevé au stade DN2-DN3 puis au stade DP. La recombinaison V(D)J se déroule en phase G0/G1 du cycle cellulaire afin

d'éviter la présence de cassures double brins potentiellement délétères pour la cellule pendant les phases de réplication de l'ADN et de division cellulaire. Chaque période d'intense prolifération cellulaire est en effet accompagnée de l'extinction de la transcription des gènes RAG (Wilson et al., 1994). Cette restriction est également assurée par la régulation post-traductionnelle de RAG-2. RAG-2 est phosphorylée à la transition G1-S par le complexe CyclinA/CDK2 sur la Thréonine 490 (Lee and Desiderio, 1999; Lin and Desiderio, 1993). Cette phosphorylation provoque son ubiquitination suivi probablement de sa dégradation par le protéasome (Li et al., 1996). RAG-1 est stabilisée par RAG-2 et la dégradation cycle spécifique de RAG-2 provoque probablement celle de RAG-1. La mutation de la Thréonine en Alanine provoque une accumulation de RAG-2 en dehors des phases G0/G1. Cette accumulation provoque l'apparition de JS aberrantes probablement dues à une coupure imprécise par la recombinaise (Lee and Desiderio, 1999). Le contrôle strict de l'expression des protéines RAG-1 et RAG-2 est donc fondamental pour la précision des coupures et leur résolution.

2.4.2. Accessibilité des loci et chromatine

Dans la cellule, le génome est compacté en « collier de perle » grâce à l'enroulement de l'ADN autour d'un complexe protéique : le nucléosome. La formation de superstructures à base de ce collier de perles augmente le compactage et mène à la formation du chromosome qui représente l'état le plus condensé de l'ADN. L'état de condensation de l'ADN constitue un premier niveau de régulation de l'accessibilité des gènes.

Le nucléosome est composé de protéines histones : 2 histones H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 histones H4. Les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles consistant en acétylation, méthylation et ubiquitinylation. L'ensemble des modifications a lieu sur la queue des histones et est appelé le code histone. Le code histone va traduire un état actif ou répressif de la chromatine en matière de transcription. La méthylation des histones H3 dépend de l'ubiquitinylation de l'histone H2B par RAD6 (Ng et al., 2002). RAG-1 possède une activité ubiquitin ligase (Jones and Gellert, 2003) et pourrait être impliquée dans la signalisation de l'état de recombinaison de la cellule. L'état de méthylation de l'ADN influe aussi sur la capacité des gènes à être traduits. Cette méthylation de l'ADN a lieu au niveau des cystéines situées dans les îlots CpG. Elle est le fait d'enzymes appelées cytosines 5-methyltransférases. L'étude de la structure de la chromatine associée à un locus Ig ou TCR accessible et actif montre un état d'hypométhylation de l'ADN. La méthylation est donc associée à un état de répression de la transcription. La méthylation du site CpG dans la RSS de D β 1 est même

capable d'empêcher le clivage par les protéines RAGs (Whitehurst et al., 2000). Il semble aussi que l'ADN méthylé favorise le recrutement d'histones désacétylases accroissant encore la répression de la transcription (Jones et al., 1998).

L'implication des modifications post-traductionnelles des protéines histones dans la régulation de l'accessibilité est maintenant couramment admise. Cela reste cependant un domaine complexe où l'on commence tout juste à décrypter le code histone. Chez les souris RAG-2^{-/-} ou RAG-2^{-/-} transgéniques pour la chaîne TCR β , la région AJ est peu acétylée au stade DN alors que la région TCRD est hyperacétylée et par conséquent accessible à la recombinaison. En réponse aux signaux permettant le passage en DP, la région AJ devient accessible par hyperacétylation, permettant ainsi la recombinaison ADV-AJ. L'acétylation notamment sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3-K9) est associée à un état actif de la chromatine. Récemment Osipovich a montré que l'H3-K9 méthyle transférase G9a est capable d'inhiber la recombinaison V(D)J, annihilant l'effet du promoteur de D β et de l'enhanceur présent sur le minilocus β . L'inhibition se fait par modification du code histone au niveau du promoteur pD β qui passe d'un état H3-K9 hypoacétylé et hyperméthylé à H3-K9 hypométhylé et hyperacétylé, combiné à une hyperméthylation de H3-K4 et une acétylation de H4. Les promoteurs et enhanceurs ont le pouvoir de modifier ce code. Cette modification s'accompagne d'une inhibition de la transcription germinale et d'une méthylation de l'ADN au voisinage des sites de fixation de G9a (Osipovich et al., 2004). Le contrôle du code histone et de la méthylation de l'ADN au niveau des loci TCR et Ig semble au moins en partie dévolu aux enhanceurs (Mathieu et al., 2000).

2.4.3. Enhanceurs

Les enhanceurs ont été initialement impliqués dans la régulation de la transcription des gènes.

Au niveau du locus TCRA deux régions régulatrices ont été décrites : l'enhanceur TCR α (E α) et l'enhanceur TCR δ (E δ) (Figure 7). E α est situé en aval du segment AC. E δ se situe entre les gènes DJ2 et DC dans le locus TCRA (Redondo et al., 1990). L'analyse des différents loci a permis la mise en évidence de leur importance dans la recombinaison des gènes.

Ils sont responsables de la spécificité tissulaire des réarrangements et du contrôle du réarrangement au cours de l'ontogénie (Capone et al., 1993; Lauzurica and Krangel, 1994). L'utilisation d'un minilocus transgénique delta portant soit E α et E δ a ainsi montré que le

réarrangement de ce minilocus sous le contrôle de E α ne peut se faire que dans les thymocytes $\alpha\beta$ (Lauzurica and Krangel, 1994). Une souris transgénique délétée pour E α a été générée. Cette souris présente un blocage presque complet au stade DP provenant de son inaptitude à réarranger les gènes codant pour la chaîne α du TCR. E α est un enhanceur puissant dont l'activité couvre plus de 70kb et l'on pensait que son activité était limitée aux lymphocytes $\alpha\beta$ par le LCR et des silenciers de transcription situés respectivement en 3' et en 5' de E α . (Diaz et al., 1994; Winoto and Baltimore, 1989). Cependant les substrats de recombinaison placés sous le contrôle seul de E α gardent la spécificité de lignage (Capone et al., 1993) E α est donc bien impliqué dans la régulation de l'accessibilité du locus alpha. Il est possible que E α régule le réarrangement endogène en influant en cis sur l'activité de transcription germinale du TEA et d'autres promoteurs situés dans la région AJ. Son activité est détectable à 17 jours fœtal au moment de la génération des premiers thymocytes DP. L'activité de E α est donc soit limitée aux thymocytes DP soit nécessaire à leur génération.

L'activité de l'enhanceur de transcription E δ est plus précoce (J15 fœtal) que celle de E α . Sa délétion entraîne une réduction d'environ 10 fois du nombre de cellules $\gamma\delta$ mais leur répertoire reste normal et diversifié. Le taux de transcription est aussi normal (Monroe et al., 1999b). Ce dernier résultat s'explique par le fait que E δ n'est nécessaire à la régulation de la transcription que dans les cellules immatures. Après l'expression du TCR $\gamma\delta$, la transcription passe sous le contrôle de E α (Monroe et al., 1999b; Sleckman et al., 1997). Curieusement, bien que E δ soit situé à proximité des segments AJ, sa délétion n'influe pas sur le développement des LT $\alpha\beta$ (Monroe et al., 1999b). Devant la faible distance d'action de E δ , Zhong et al ont suggéré l'existence d'un élément « isolateur » alpha delta (BEAD : blocking element alpha delta) empêchant toute action de E δ sur la région AJ. La fonction d'un « isolateur » dépend de sa localisation. *In vitro*, il est capable de bloquer l'activité d'un enhanceur lorsqu'il est inséré entre celui ci et le promoteur d'un gène qu'il contrôle quelle que soit sa distance à l'enhanceur.

BEAD est situé chez l'homme entre le gène DV103, à la fin locus delta et le TEA (Figure7) (Zhong and Krangel, 1997). Sa position chez la souris entre E δ et les segments AJ restreint donc l'activité de E δ aux gènes ADV, DD DJ et DC. La séquence de BEAD chez la souris est relativement différente de celle de BEAD chez l'homme et sa capacité de blocage de la transcription E δ dépendante en est affectée. L'inactivation de BEAD dans la souris n'influe d'ailleurs ni sur le développement des thymocytes ni sur la spécificité temporelle des

réarrangements des gènes TCRD et TCRA (Sleckman et al., 2001). D'autres mécanismes sont donc probablement mis en jeu pour rendre actif l'enhanceur E δ en DN sans que son activité affecte la structure chromatinienne de la région AJ. Les enhanceurs sont donc impliqués dans le contrôle lignage spécifique des réarrangements probablement médié par des différences dans les facteurs cis activateurs présents (pour une revue : Sleckman Annu rev immunology 1996).

Chez la souris, la délétion de l'enhanceur β provoque l'interruption de la différenciation au stade DP et la transcription germinale ainsi que les réarrangements TCRB sont presque complètement inhibés (Bouvier et al., 1996). La transcription germinale permettrait « d'ouvrir » la région transcrite, la rendant ainsi accessible à la machinerie de la recombinaison. E β agit en remodelant la chromatine sur un domaine d'environ 25 kb qui s'arrête en 5' de D β 1 (Mathieu et al., 2000). Cependant le mécanisme d'action de l'enhanceur ne réside pas exclusivement dans le contrôle de l'accessibilité puisque l'étude de Hempel et al montre certes, une diminution de l'ordre de 10 fois du clivage par RAG-1/RAG-2 au niveau des gènes TCRB, mais surtout une diminution drastique (300 fois) de la religation des extrémités codantes. L'enhanceur β est donc impliqué dans le contrôle de la réparation par NHEJ (Hempel et al., 1998).

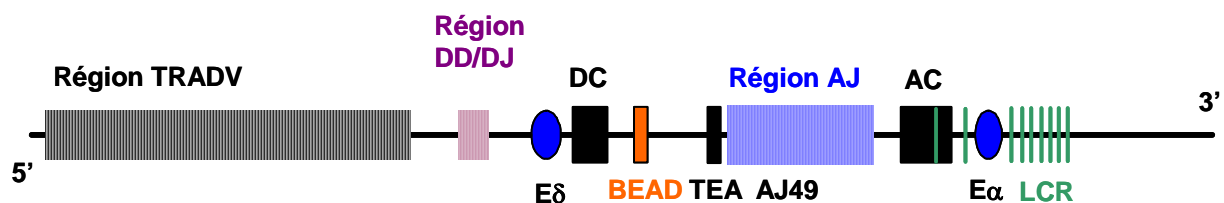


Figure 7 : Localisation des séquences régulatrices du locus TCRAD. L'enhanceur E δ , situé en amont de DC régule l'accessibilité de la chromatine sur environ 10 kb ; Le promoteur TEA régule l'accessibilité de la chromatine sur les 9 premiers segments de la région 5'AJ en coordination avec le promoteur associé à AJ49. L'enhanceur E α est situé en aval du locus TCRAD et régule l'accessibilité de la chromatine sur plus de 70kb en agissant avec le TEA et le LCR. Le LCR est caractérisé par 9 sites de sensibilité à la DNaseI et serait impliqué dans la régulation tissu spécifique du locus TRAD au cours de la différenciation thymique.

2.4.4. T Early α (TEA)

C'est à partir de ce promoteur situé en amont de la région AJ que s'initient des transcrits germinaux (de Villartay et al., 1987). Ces transcrits ne sont pas traduits et leur expression diminue au cours de l'ontogénie avec l'apparition des LT matures. La séquence du TEA est très conservée entre l'homme et la souris. C'est un site de fixation pour des facteurs de transcription capable de servir de promoteur à un gène rapporteur mais son activité est limitée au LT $\alpha\beta$. Il est impliqué dans la régulation des réarrangements. Sa délétion dans les souris TEA^{-/-} provoque une forte diminution des transcrits germinaux et de l'utilisation des AJ proximaux (AJ61-AJ53) sans affecter ni la cellularité thymique ni le développement des LT $\alpha\beta$ (Villey et al., 1996). Son activation durant la transition DN/DP (Wilson et al., 1996) pourrait promouvoir l'ouverture à courte distance de la région AJ en influant sur la structure de la chromatine au niveau des segments AJ et favoriser l'engagement dans la voie $\alpha\beta$. Cette hypothèse est vérifiée dans l'analyse de Mauvieux qui met en évidence une inaccessibilité de la région AJ61-AJ53 à la nucléase micrococcale probablement liée au défaut d'acétylation de la queue de histones H3 et H4 dans cette région (Mauvieux et al., 2003). Le TEA n'est cependant pas indispensable à l'accessibilité de la région AJ probablement car d'autres promoteurs sont retrouvés tout au long de cette région et en contrôlent l'accessibilité localement. Ainsi la délétion du TEA provoque l'activation de promoteurs préalablement réprimés ce qui se traduit par une forte augmentation des transcrits de la région centrale de la région AJ (AJ47-AJ37). Dans cette même étude les auteurs mettent en évidence un promoteur associé à AJ49 qui contrôle l'accessibilité des segments AJ50 à AJ45 en jouant sur l'acétylation de la chromatine (Hawwari et al., 2005). Ce promoteur prendrait le relais du TEA et ciblerait les réarrangements primaires sur ces 6 gènes AJ. Une étude parue en 2002 montrait cependant que plus que la transcription germinale et l'acétylation des histones c'est la localisation et l'orientation des promoteurs présents dans chaque segment V et en amont de segments D et J qui influe sur l'efficacité de la recombinaison (Sikes et al., 2002). De plus le LCR aurait une action de contrôle à distance de ces promoteurs pour induire l'accessibilité chromatinienne (Ortiz et al., 1999).

Il semble au final que l'accessibilité des gènes soit régulée par de nombreux facteurs qui agissent de manière synergique.

2.5. Restriction des réarrangements au-delà de la règle 12/23

La recombinaison V(D)J est ciblée au niveau des gènes TCR par les RSS (Tonegawa, 1983). Seuls deux gènes ayant des RSS différentes (espaceur de 12 et 23 pb) sont réarrangés.

La règle 12/23 est dictée au niveau de la reconnaissance et de la coupure par les protéines RAG (van Gent et al., 1996). Elle prévient les réarrangements aberrants en forçant la reconnaissance des deux partenaires préalablement à l'introduction de toute coupure. Bassing et al ont mis en évidence un niveau supplémentaire de régulation au niveau du locus TCRB (Bassing et al., 2000). Au niveau de ce locus, le réarrangement est ordonné (voir locus TCRB). Les segments BD et BJ sont d'abord assemblés. Le réarrangement BV/BD-BJ a ensuite lieu. Bien que les segments BD et BJ possèdent tous deux une RSS 12 en 5' la plupart des réarrangements TCR β comportent un segment BD et il ne semble pas y avoir de réarrangement direct des segments BV avec un segment BJ. L'étude de réarrangement sur des minilocus transgéniques contenant un seul cluster BD-BJ (Sleckman et al., 2000) montre que, en dépit de la compatibilité avec la règle 12/23, il n'y a pratiquement jamais de réarrangement BV/BJ. Cette régulation est dictée par les RSS associées à ces gènes qui restreignent la recombinaison V(D)J au-delà de la règle 12/23 (restriction B12/23). La délétion de BD1 ne permet pas non plus le réarrangement direct BV/BJ. Les travaux de Jung et al montrent par l'étude *in vitro* de la recombinaison de minilocus que la règle B12/23 dépend de la séquence des heptamères et nonamères et dans une moindre mesure de la séquence de l'espaceur. Ils tempèrent cependant les résultats de Bassing en montrant une influence de la séquence codante des gènes BV sur la recombinaison (Jung et al., 2003). Leurs résultats montrent de plus que la règle B12/23 est maintenue dans des cellules non lymphoïdes, excluant ainsi tout rôle pour des facteurs spécifiques agissant en cis.

3. LE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T

Récemment, une avancée technique majeure permettant la culture et le développement de précurseurs lymphocytaires *in vitro* a permis d'étudier plus facilement le potentiel de différenciation de différentes sous populations triées. La lignée cellulaire stromale de moelle osseuse OP9 sert de support à la culture. Partant de la constatation que la reconstitution de souris avec des progéniteurs de moelle osseuse surexprimant la forme activée de Notch s'accompagne d'une lymphopoïèse T dans la moelle (Pui et al., 1999), Schmitt et al ont transfecté la lignée OP9 avec le ligand de Notch : Delta-like1 (DL1). L'expression ectopique de DL1 sur les cellules OP9 permet de supporter *in vitro* la différenciation complète des thymocytes et des NK à partir de leurs précurseurs respectifs (Schmitt et al., 2004).

3.1. Le thymus

L'épithélium thymique est formé par la fusion de tissus endodermique et de tissus ectodermique. Ces précurseurs épithéliaux vont s'expandre à partir du 11 jour fœtal sous l'influence de l'arrivée des premières cellules hématopoïétiques. Chez la souris l'organe adulte (4 semaines) comprend environ 200 millions de cellules et le stroma thymique est, à ce moment, composé en plus des cellules épithéliales, de fibroblastes, de DC, de LB et de macrophages. La structure du thymus délimite des niches dans lesquelles vont migrer les thymocytes au cours de leur maturation. La zone périphérique forme le cortex tandis que le centre est appelé médulla. Les précurseurs thymiques entrent à la jonction cortico-médullaire et une petite fraction se différencie en DC, NK, NKT et LT $\gamma\delta$. Une fois engagés dans la voie $\alpha\beta$, les pro- thymocytes migrent jusqu'à la région sub-capsulaire où ils s'expandent sous le contrôle des cellules d'origine mésodermiques et épithéliales. Ils vont se développer jusqu'au stade DP puis reprendre leur migration à travers le cortex où ils vont subir la sélection positive. Tout en achevant leur différenciation, ces thymocytes sont soumis à la sélection négative qui est optimale au niveau de la médulla et deviennent CD4⁺ ou CD8⁺ SP (Lind et al., 2001; Naquet et al., 1999).

La différenciation des progéniteurs de LT peut être suivie par l'analyse de l'expression de protéines de surface. La différenciation des lymphocytes est nécessaire à la structuration du thymus puisque son blocage provoque généralement une diminution de la cellularité thymique accompagnée de défaut d'organisation (van Ewijk et al., 2000). Le réarrangement séquentiel des chaînes du TCR va se dérouler durant cette maturation et leur expression en surface du thymocyte dans le contexte du pré-TCR puis du TCR va réguler de manière très fine cette différenciation. Le stroma thymique influence aussi le développement des thymocytes en

produisant des cytokines comme l'IL2, l'IL7 et le SCF impliquées dans la prolifération cellulaire (Di Santo and Rodewald, 1998; Yarilin and Belyakov, 2004). Il joue d'autre part un rôle primordial dans la sélection du répertoire TCR grâce aux molécules de CMH de classe I et II présentes à sa surface.

3.2. Les précurseurs

La colonisation du thymus va s'effectuer en plusieurs vagues successives durant le développement embryonnaire. Les lymphocytes comme toutes les cellules sanguines proviennent d'un précurseur commun : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'hématopoïèse est initiée au jour 10 embryonnaire dans le sac vitellin. Entre les jours 10 et 12 on retrouve de nombreux précurseurs multipotents qui vont gagner le foie où se poursuit l'hématopoïèse à partir du 11ème jour. Comme la colonisation du thymus par des progéniteurs prend place durant cette vague de circulation de progéniteur, il est possible que les précurseurs thymiques soient des CSH ou qu'ils soient au moins totipotent. Ils peuvent donc se différencier en LB ou LT indifféremment. La recherche des précurseurs thymiques a été initiée au niveau du foie fœtal avant de se tourner vers les populations de précurseurs migrant dans le sang fœtal juste avant la colonisation du thymus. Les résultats obtenus sont disparates comme le montre les études citées ci dessous.

Sagara et al ont ainsi trouvé une population cellulaire dans le foie fœtal capable de produire des lymphocytes T, B et des macrophages (Sagara et al., 1997). Ces cellules expriment c-kit, CD44, expriment Sca-1 fortement et n'expriment pas CD3, CD4, CD8, Thy-1 et CD25. Une étude plus récente des précurseurs fœtaux propose un modèle où les CSH se différencient en donnant des précurseurs successifs de plus en plus spécialisés dans leur capacité de production cellulaire (Min et al., 2004).

Dans le but d'identifier le précurseur colonisant le thymus, la caractérisation des progéniteurs circulant dans le sang fœtal semble être une bonne voie d'approche. Deux populations ont été purifiées et l'utilisation du test MLP (Multilineage Progenitor assay) a permis de montrer qu'une population purifiée Thy-1⁻, c-kit⁺ conservait la capacité de se différencier en cellules lymphoïdes et myéloïdes comme les progéniteurs retrouvés dans le foie (Min et al., 2004; Sagara et al., 1997). L'autre population Thy-1⁺, c-kit^{low} ne produit que des LT suggérant que les précurseurs puissent être engagés dans le lignage T avant d'entrer dans le thymus. Cette hypothèse rejoint l'étude de Rodewald qui met en évidence l'existence de pro-thymocytes Thy-1⁺, c-kit^{low}, CD3⁻ ayant initié le réarrangement BD/BJ (Rodewald et al., 1994). La population IL-7R⁺ c-kit⁺, Lin⁻ contient des précurseurs p-B et p-Ts. Au jour 13

les p-Ts sont largement majoritaires et conservent la capacité de produire des LT, DC et NK (Ikawa et al., 2004). Il semble au final qu'il existe une grande variété de précurseurs circulants plus ou moins engagés dans un lignage cellulaire dont la fréquence chute significativement avec le développement du fœtus pour devenir pratiquement indétectable après le jour 15 de gestation.

A la naissance, l'hématopoïèse est prise en charge par la moelle osseuse et les progéniteurs lymphoïdes communs produits sont alors IL7R⁺, CD44⁺, CD25⁻, Thy-1⁻, c-kit^{low}, B220⁻, Sca-1^{low} (Kondo et al., 1997) et sont incapables de générer des cellules myéloïdes. Une autre population capable de produire des lymphocytes T et B constitue un meilleur candidat à la colonisation du thymus de par son phénotype (IL7R⁺CD44⁺CD25⁻Thy-1⁺CD4^{low}) plus proche de celui de la population thymocytaire la plus immature (Wu et al., 1991b). Encore aujourd'hui personne n'a donc pu démontrer formellement l'existence d'un précurseur commun ou prouver que les précurseurs colonisant le thymus sont déjà restreints à un lignage. La question reste ouverte.

3.3. Différenciation des thymocytes.

3.3.1. Stade DN

Les thymocytes les plus immatures sont les cellules doubles négatives pour CD4 et CD8 (DN) parfois aussi appelées triples négatives (TN) en référence à l'absence d'expression du complexe CD3. Cette population représente 3 à 4% des thymocytes totaux. Elle peut être subdivisée en 4 sous populations en fonction de l'expression de CD44 et CD25 (Godfrey et al., 1993). Les thymocytes se différencient depuis le stade DN1 (CD44⁺, CD25⁻) jusqu'au stade DN4 (CD44⁻,CD25⁻) en passant successivement par les stades DN2 (CD44⁺,CD25⁺) et DN3 (CD44⁻,CD25⁺) (Figure 8).

La population DN1 est fortement hétérogène et l'utilisation du marqueur c-kit permet de mieux définir les progéniteurs T (Ceredig and Rolink, 2002). Il est couramment admis qu'en plus de précurseurs restreints au lignage T, elle est composée de DC, NK et LB matures. La potentialité des précurseurs reste cependant sujette à controverse. L'étude de Wu (Wu et al., 1991a) a montré que les cellules DN1 expriment faiblement CD4 et sont capables de donner des lymphocytes B rappelant les précurseurs CLPs mis en évidence par Kondo (voir plus haut). De plus le blocage du développement des lymphocytes α/β dans les souris TCR $\beta^{-/-}$ s'accompagne d'une augmentation du nombre de LB (20X) dans le thymus suggérant que les cellules colonisant le thymus sont bien des CLPs capable de donner soit des cellules T

soit des cellules B (Akashi et al., 2000). Aucune de ces études ne confirme cependant phénotypiquement la présence des CLPs, et ne peut exclure la présence d'un mélange de progéniteurs. D'ailleurs une étude plus récente (Balciunaite et al., 2005) montre que les cellules DN1, caractérisées plus finement par l'utilisation du marqueur c-kit ($CD44^+, CD25^-, c\text{-kit}^+$), et cultivées sur OP9-DL ou différenciées en FTOC sont incapables de produire de LB et ne possèdent aucun transcrit spécifique des LB. La population DN1 $c\text{-kit}^-$ par contraste possède une grande variété de marqueurs spécifiques de lignages non T ($CD19$, $NK1.1$, $CD11c$, $CD11b$) (Balciunaite et al., 2005; Ceredig and Rolink, 2002). Il est donc possible que comme au niveau du sang, il existe un mélange de précurseurs ayant des potentiels de différenciation différents.

C'est à la transition du stade DN1 au stade DN2 que s'initie la prolifération des thymocytes (Laurent et al., 2004; Penit et al., 1995). Les thymocytes DN2 conservent la capacité de donner des cellules dendritiques, des macrophages et des NK (Balciunaite et al., 2005; Wu et al., 1991a) C'est à ce stade que se déroule le réarrangement des gènes codant pour les chaînes $TCR\gamma$ et $TCR\delta$. Le réarrangement de gènes $TCRB$ est aussi initié puisque les réarrangements des segments BD avec les segments BJ sont détectables dans une minorité de thymocytes (Capone et al., 1998).

La transition du stade DN2 au stade DN3 s'accompagne d'un arrêt de la prolifération des thymocytes. Les thymocytes ayant réarrangé leurs gènes $TCRD$ et $TCRG$ s'engagent définitivement dans le lignage LT γ/δ . Cette population est cependant minoritaire et la majorité des thymocytes recombinent leurs gènes $TCRB$ durant le stade DN3. Statistiquement, en raison de la forte diversité jonctionnelle introduite lors de la recombinaison $V(D)J$, seul 1/3 des thymocytes présente un réarrangement en phase et commence à produire une chaîne $TCR\beta$. Cette chaîne $TCR\beta$ s'apparie avec la chaîne $pT\alpha$ codée par un gène invariant et le complexe $CD3$ pour former le pré-TCR. Son expression en surface s'accompagne d'un signal pré-TCR intra cellulaire provoquant l'arrêt des réarrangements du locus $TCRB$ et la survie des thymocytes. En absence de ce signal les thymocytes entrent en apoptose. Ce processus est appelé la sélection beta (voir section 2.8). Les thymocytes sélectionnés perdent le marqueur de surface $CD25$ et se mettent à proliférer fortement. Cette prolifération dépend du signal délivré par Notch qui a une influence sur le devenir des thymocytes tout au long de la différenciation (voir section 2.9.2).

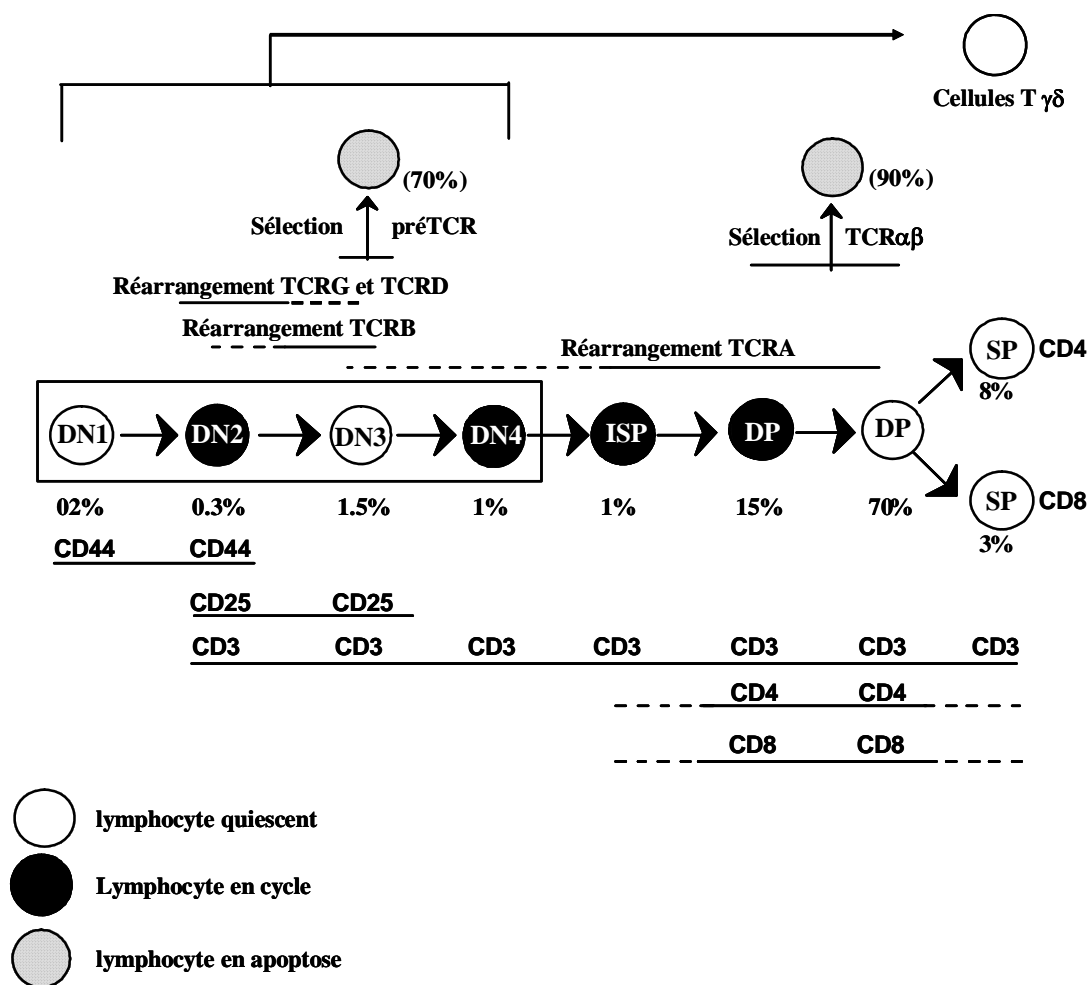


Figure 8 : La différenciation intrathymique des lymphocytes T. Les différents stades de maturation et leurs marqueurs sont indiqués ainsi que le pourcentage de thymocytes à chaque stade. Le réarrangement des gènes TCR est indiqué par des lignes pleines et des lignes pointillées au stade où ils prennent majoritairement place. Le stade exact de l'engagement des LT dans la lignée $\gamma\delta$ reste peu clair

3.3.2. Stade DP

Les cellules engagées dans la voie $\alpha\beta$ et ayant reçu le signal de survie expriment les corécepteurs CD4 et CD8 et entrent au stade DP ($CD4^+$, $CD8^+$) en passant rapidement par un stade DN4 puis un stade immature simple positif (ISP) $CD8^{low}$ ou $CD4^{low}$. Il est cependant possible que seule une fraction des thymocytes transite par un stade ISP. La population DP représente environ 85% des thymocytes chez une souris adulte. Ce stade est marqué par le réarrangement des gènes TCRA, l'expression du TCR en surface et les processus de sélection.

Le TCR γ/δ n'est généralement pas associé aux corécepteurs CD4 et CD8 chez la souris.

3.3.3. Réarrangement TCRA

Si quelques thymocytes initient le réarrangement TCRA au stade DN3 en absence de pré-TCR (Mancini S JI 2001), leur transcription est encore indétectable et c'est lors de la transition DN/DP que sont massivement recombinaisonnés et transcrits les gènes codant pour la chaîne alpha du TCR. Les thymocytes DP expriment alors un faible niveau de TCR α/β . Contrairement au locus β , le réarrangement peut continuer sur l'autre allèle même en présence d'un réarrangement productif et l'on considère que la majorité des cellules α/β ont réarrangé leurs deux allèles (Malissen et al., 1992; Petrie et al., 1993). Si l'on peut trouver des réarrangements β dans les lymphocytes γ/δ , le réarrangement TCRA s'accompagne de par la structure du locus TCRA de l'excision complète des gènes TCRD et l'engagement dans la voie α/β est définitive.

3.3.4. La sélection thymique

Les thymocytes vont maintenant subir un processus de sélection basé sur l'affinité de leur TCR pour les complexes CMH/peptides endogènes exprimés dans le thymus. Cette sélection vise à éliminer les thymocytes potentiellement auto réactifs et assurer la restriction au soi. Elle se déroule en deux étapes successives: la sélection négative puis positive (Figure 9). Trois cas de figure peuvent se présenter (Alam et al., 1996). Si l'interaction TCR/CMH est trop faible lors de la sélection positive, les thymocytes sont « inutiles » et meurent par négligence. Une interaction trop forte par contre provoque l'apoptose des thymocytes lors de la sélection négative. Finalement seuls les thymocytes présentant des TCR d'affinité et d'avidité intermédiaire sont sélectionnés (Ashton-Rickardt et al., 1994). Les peptides présentés proviennent de protéines du soi. L'importance de ces peptides a été mise en évidence par plusieurs études successives. L'étude de la différenciation des thymocytes en culture organotypique (FTOC) de souris déficientes en β 2-microglobuline ou mutées pour TAP (Ashton-Rickardt et al., 1994), le transporteur impliqué dans la charge en peptide du CMH, montre qu'en absence de chargement des molécules de CMH de classe I, et donc de leur expression stable en surface, la différenciation est bloquée au stade DP. Ce blocage peut être levé en ajoutant des peptides exogènes se liant au CMH. L'augmentation de charge en peptide (exogènes + endogènes) lorsque la souris est hétérozygote pour la délétion de la β 2-microglobuline provoque la sélection négative (Hogquist et al., 1994). Ces résultats

supportent tous deux la notion de sélection par avidité. De la même manière, les souris déficientes pour la cathepsine ne peuvent plus dégrader la chaîne invariante impliquée dans l'assemblage du CMH de classe II. Ces souris présentent un défaut de la sélection positive et ne parviennent pas à développer de LT CD4⁺ (Benavides et al., 2001).

3.3.4.1. La sélection positive

Les thymocytes DP migrent au niveau du cortex thymique où ils vont séjourner 3 à 5 jours au contact des cellules corticales épithéliales qui expriment peu de molécules de CMH (Bousso et al., 2002; Lind et al., 2001). Les cellules DP sont encore immatures et possèdent une faible densité de complexe TCR en surface. La sélection s'effectue ainsi sur la quantité et la force d'interaction TCR/CMH entre les DP et les cellules corticales. Dans ces conditions seules quelques cellules contractent une interaction suffisante pour induire un signal TCR intracellulaire de survie (Alam et al., 1996). Les cellules ayant franchi cette étape, durant laquelle jusqu'à 90% des thymocytes vont mourir par négligence, augmentent l'expression du TCR, de CD5 et expriment CD69. L'arrêt de la transcription des gènes RAGs induit par la sélection positive marque aussi la fin du réarrangement TCRA (Kouskoff et al., 1995).

3.3.4.2. La sélection négative

La sélection négative se déroule dans la médulla, prend une quinzaine de jours (Scollay and Godfrey, 1995) et va éliminer les cellules reconnaissant les complexes CMH/peptides avec une affinité trop élevée (revue :Laufer T seminar immunology 1999). Dans cet environnement thymique, ce complexe est principalement porté par des cellules présentatrices de l'antigène (LB et cellules dendritiques résidentes). En absence de cellules d'origine hématopoïétique l'induction de la tolérance au soi peut être assurée par les cellules épithéliales corticales même si l'efficacité est notablement réduite (Goldman et al., 2005; Houssaint and Flajnik, 1990). Cette sélection nécessite en plus l'expression de molécules de co-stimulation retrouvées à la surface des cellules présentatrices de l'Ag comme CD80 et CD86 (Degermann et al., 1994; Page, 1999) et l'expression des co-récepteurs CD5, CD28 et TNFR par les thymocytes. La stimulation du TCR d'une cellule DP et un ou plusieurs de ces co-récepteurs provoque son entrée en apoptose et permet l'élimination des cellules ayant une affinité trop élevée pour le soi. La fin de la sélection négative est marquée par la perte du marqueur CD4 ou de CD8 selon la classe du CMH reconnue lors de la sélection. Les cellules progressent ainsi au stade SP.

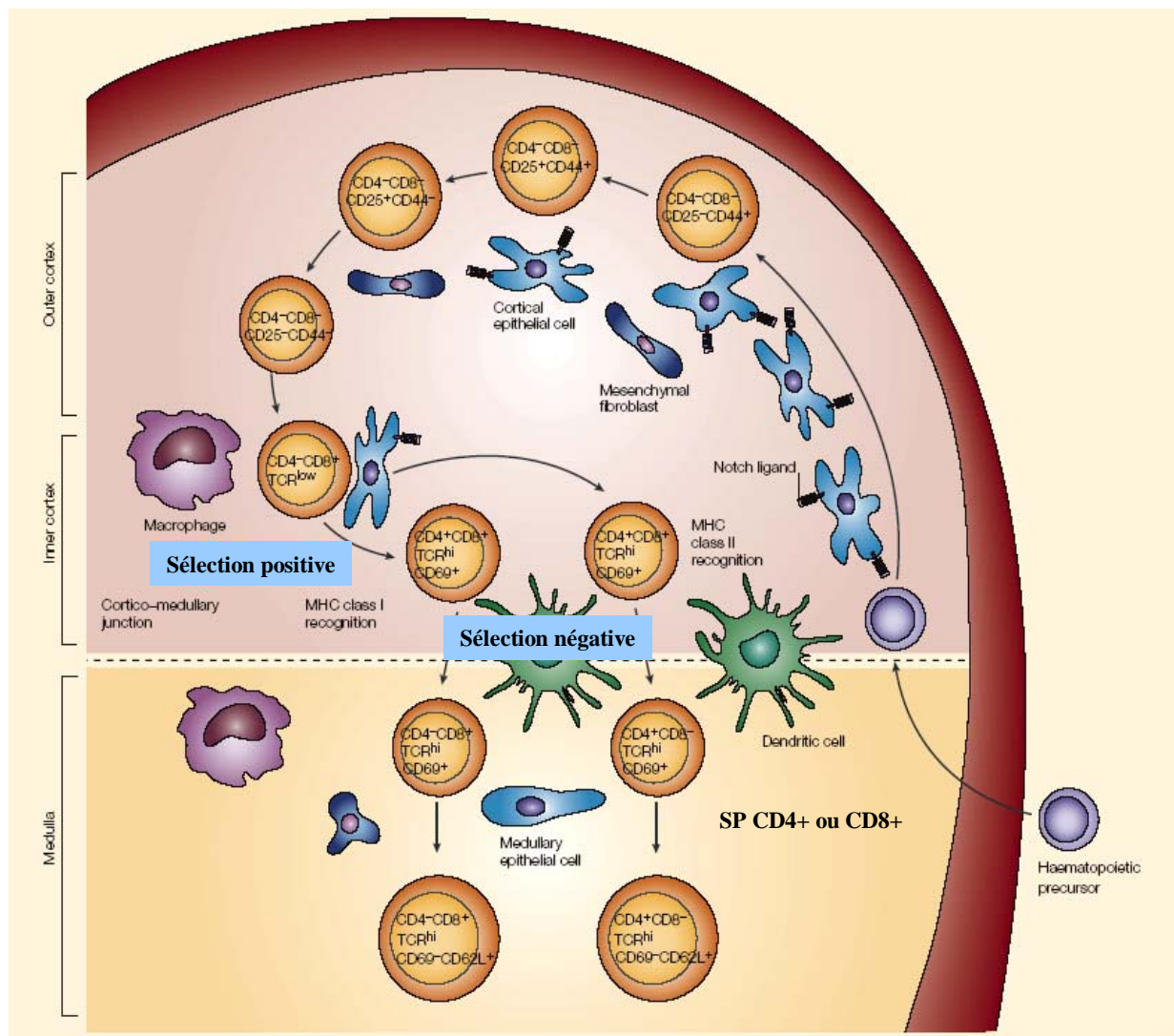


Figure 9 : Localisation de la différenciation thymique et cellules impliquées. Les précurseurs rentrent à la jonction cortico médullaire, gagnent le cortex et se différencient jusqu'au stade SP au contact des cellules corticales épithéliales sous l'influence de différents signaux dont la signalisation Notch. Les thymocytes subissent ensuite la sélection positive par l'interaction de leur TCR avec les molécules de CMH de classe I et II exprimées par les cellules corticales épithéliales. Les thymocytes gagnent enfin la médulla où ils vont subir la sélection négative au contact des cellules présentatrices de l'antigène. Moins de 1% des LT survivront à ces deux sélections conjointes et gagneront la périphérie en étant restreints au soi. Adapté de (Zuniga-Pflucker, 2004)

3.3.5. Stade SP

Les LT matures qui portent un TCR $\alpha\beta$ à leur surface expriment aussi les co-récepteur CD4 ou CD8. Ces co-récepteurs ont pour ligand le CMH de classe I pour CD8 ou le CMH de

classe II pour CD4. Ces co-récepteurs stabilisent l'interaction entre le TCR et le complexe CMH et favorisent l'activation du LT mature. Le choix du co-récepteur s'effectue durant la sélection et au moins deux modèles s'opposent sur la manière dont le choix du lignage CD4⁺ ou CD8⁺ s'effectue. Le modèle stochastique pour lequel le choix se fait au hasard indépendamment de la spécificité de reconnaissance du TCR et de sa signalisation. Le modèle instructif pour lequel le choix se fait durant la sélection positive. Le co-récepteur le plus à même d'induire un signal TCR est conservé. Consécutivement, l'expression du second récepteur est inhibée (Bhandoola et al., 1999).

Une première constatation supporte le modèle stochastique : dans les souris sauvages, le rapport CD4/CD8 diffère selon le fond génétique, excluant l'influence de la sélection thymique. D'autre part la présence de LT CD4⁺ périphériques activables dans les souris déficientes en molécules du CMH de classe II suggère que le choix de ce lignage s'est fait indépendamment de la spécificité de leur TCR (Robey et al., 1994). La faible proportion de ces cellules par rapport à celle retrouvée dans les souris sauvages laisse cependant la porte ouverte au modèle instructif. Ce modèle est d'ailleurs fortement supporté par les études de Yatsumoto et de Liu qui montrent que la durée du signal TCR contrôle le choix entre les lignages auxiliaire et cytotoxique (Liu and Bosselut, 2004; Yasutomo et al., 2000). La génération de lymphocytes SP CD4⁺ nécessite un signal TCR prolongé au-delà du stade DP puisque dans les souris où ZAP70 est exprimée uniquement au stade DP, le signal TCR ne perdure pas au stade SP et seul un engagement dans le lignage CD8⁺ est observé. Le choix de la lignée semble en fait se dérouler en deux étapes puisque la stimulation de cellules DP provoque une diminution de l'expression de CD8 dans un premier temps. Un deuxième signal pouvant provenir de récepteurs de surface ou de l'arrêt de la signalisation TCR peut ensuite provoquer la réexpression de CD8 (Brugnera et al., 2000). Le choix CD4 vs CD8 semble au final dépendre d'un mécanisme instructif comportant plusieurs étapes dissociées au cours desquelles le signal TCR mais aussi d'autres récepteurs interviennent. L'implication de Notch supporte cette vision. La surexpression de la forme active de Notch-1 sous le contrôle du promoteur de Lck provoque une forte augmentation du ratio LT CD8⁺/LT CD4⁺ (Robey et al., 1996).

La différenciation des lymphocytes est strictement dépendante des voies de signalisation activées par le TCR et le pré-TCR. Tout défaut des protéines impliquées dans la recombinaison des gènes TCR ou toute mutation des gènes codants pour le complexe CD3 provoquent invariablement un blocage du développement dont l'importance et le stade varie selon la sous unité en cause. Au niveau de la signalisation certaines protéines sont

partiellement redondantes et les phénotypes résultant de la perte de fonction peuvent être plus discrets (Malissen and Malissen, 1996) (Figure 10).

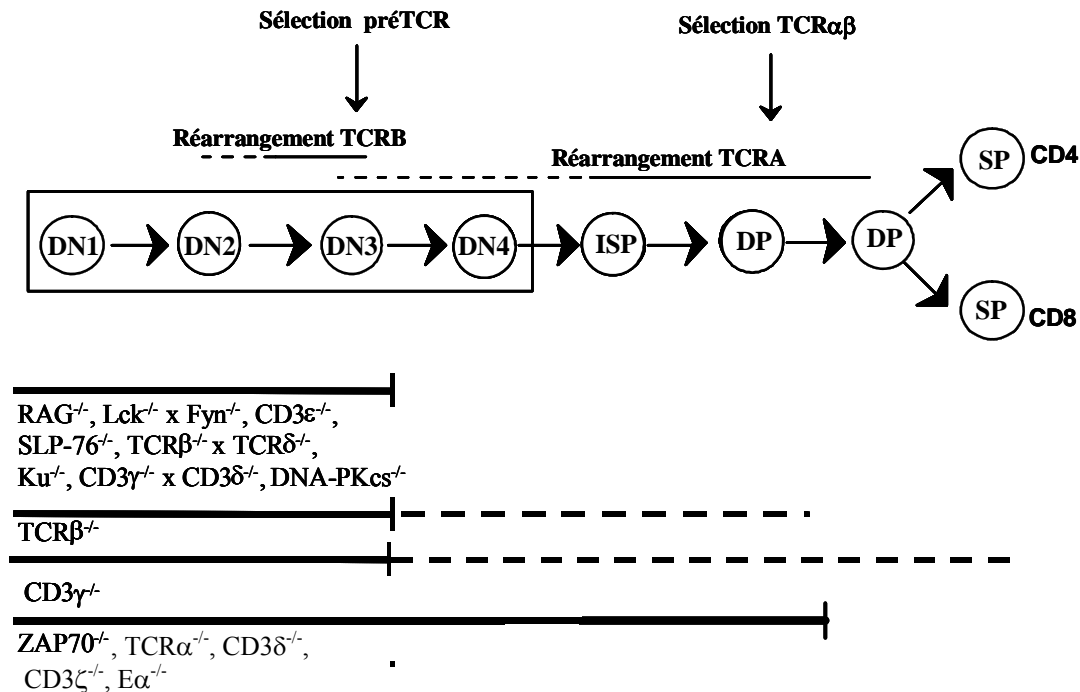


Figure 10 : Les défauts de la différenciation intra-thymique dans différentes lignées de souris génétiquement modifiées. Les barres pleines représentent les étapes de différenciation se déroulant normalement. Les barres pointillées indiquent un blocage partiel de la différenciation.

Il est à noter pour finir que toutes les étapes de la différenciation sont contrôlées par l'expression d'un panel de gènes extraordinairement complexe comme le montre très bien l'étude de Puthier et al et que nous sommes encore loin d'appréhender dans sa totalité ce qui se passe au cours de cette période critique de la vie du lymphocyte (Puthier et al., 2004).

3.4. Sélection β et pré-TCR

La sélection β qui a été succinctement introduite plus haut permet aux cellules exprimant une chaîne TCRβ dans le cadre du pré-TCR et développant une signalisation pré-

TCR de poursuivre leur différenciation. La recombinaison V(D)J introduit de nombreuses modifications à la jonction entre deux gènes et, statistiquement, un réarrangement sur trois seulement préserve une phase ouverte de lecture entre les gènes V et J et permet l'expression d'une chaîne fonctionnelle. Le « test » de la fonctionnalité du nouvel exon VJ ainsi créé dépend uniquement de l'expression de la chaîne β dans le cadre du pré-TCR (Dudley et al., 1994). Après sélection pour l'expression de la chaîne β , la proportion de thymocytes possédant un réarrangement en phase dépasse les 70% (Mallick et al., 1993). L'étude de Dudley par cytométrie de flux montre qu'environ 30% des thymocytes DN3 expriment une chaîne β intra-cellulaire. Cette proportion passe à 75% dans les thymocytes DN4. Le processus de sélection β se fait donc à la transition DN3/DN4. Le signal issu du pré-TCR promeut l'entrée en cycle par l'augmentation de l'expression des cyclines A et B, l'augmentation de l'activité de CDK2 et la dégradation de p27 (Kip1). Consécutivement, la synthèse de l'ADN est initiée. On peut constater en parallèle une diminution transitoire de RAG-2 probablement responsable de l'arrêt du réarrangement β (Hoffman et al., 1996). Ce phénomène est responsable de l'exclusion allélique décrite au niveau du locus TCRB : les LT matures contiennent en effet un seul réarrangement productif de la chaîne TCR β , le second allèle porte un réarrangement non productif, un réarrangement partiel ou plus rarement reste en configuration germinale (Casanova et al., 1991). L'expression d'un transgène codant pour une chaîne β fonctionnelle dans les thymocytes de souris sauvage inhibe presque totalement le réarrangement BV/BD-BJ endogène (Uematsu et al., 1988). Au niveau du locus TCRAD, la situation est différente puisque 30% des cellules T matures possèdent deux réarrangements alpha productifs (Casanova et al., 1991). Les cellules T peuvent d'ailleurs porter deux TCR différents partageant une même chaîne β . Cette différence de mécanisme entre le locus TCRB et TCRAD ainsi que l'inhibition des réarrangements endogènes par l'introduction d'un transgène β a fait soupçonner l'implication du pré-TCR dans le phénomène d'exclusion allélique. Ce rôle a été confirmé par l'étude des réarrangements β amplifiés par single cell PCR. En absence de pT α , le nombre de thymocytes portant deux réarrangements productifs est multiplié par 7 (Aifantis et al., 1997). De plus, les souris ayant une signalisation pré-TCR active en permanence suite à l'expression d'une forme constitutivement active de Lck, montrent une forte inhibition du réarrangement β et le passage au stade DP est rendu possible sans avoir initié la recombinaison BV/BD-BJ (Anderson et al., 1992).

Le ligand du pré-TCR reste à ce jour inconnu et il n'est pas indispensable puisque l'expression d'un pré-TCR dont la partie extracellulaire est tronquée permet la reprise du

développement des thymocytes de souris $RAG^{-/-}$ jusqu'au stade DP. $pT\alpha$ jouerait donc principalement un rôle structural. Dans les souris sauvages ce transgène suffit à provoquer l'exclusion allélique (Irving et al., 1998). Cependant l'implication du signal pré-TCR dans la sélection β est évidente puisque les thymocytes sont au moins partiellement bloqués au stade DN3 en l'absence d'un pré-TCR fonctionnel (souris $RAG^{-/-}$, $TCR\beta^{-/-}$, $pT\alpha^{-/-}$, mutants de $CD3\epsilon$, γ , mutants de signalisation pré-TCR). $pT\alpha$ n'est cependant pas impliquée dans le signal pré-TCR puisque l'utilisation d'anticorps anti $CD3\epsilon$ dans les souris $pT\alpha^{-/-}$ x $RAG^{-/-}$ ainsi que l'expression d'une chaîne $pT\alpha$ dépourvue de sa portion intra cellulaire suffit à restaurer la thymopoïèse (Fehling et al., 1997).

Les voies de signalisation activées à partir du pré-TCR sont extrêmement complexes et diversifiées. Il semble que la signalisation nécessaire à l'exclusion allélique et à la prolifération diverge en dessous de SLP76. La voie PKC est nécessaire à l'exclusion allélique (Michie et al., 2001). La voie Ras/Raf/MEK/ERK et $I\kappa B/NF-\kappa B$ provoque plutôt la prolifération et la différenciation des thymocytes. D'ailleurs l'introduction d'un transgène Ras^{V12} dans une souris normale n'arrive pas à initier l'exclusion allélique (Gartner et al., 1999). Cette signalisation provoque l'augmentation de l'expression du récepteur à l'IL7 au stade DN4 et la survie des thymocytes (Trigueros et al., 2003). La prolifération, elle, ne dépend pas de l'IL7. La régulation de l'expression des gènes cibles par ces voies de signalisation implique une multitude de facteurs de transcriptions dont le rôle reste encore à déterminer (Tabrizifard et al., 2004).

3.5. Choix du lignage $\alpha\beta/\gamma\delta$

3.5.1. Rôle du pré-TCR

La première question qui se pose est : est-ce que la divergence de lignage est due à des signaux provenant de récepteurs de surface exprimés aléatoirement au cours du développement dans un précurseur commun ou est-ce qu'au contraire les précurseurs sont déjà pré-déterminés ? Dans ce dernier cas, le $TCR\gamma\delta$ et le pré-TCR se contenteraient de fournir un signal de survie dans une cellule déjà « pré-destinée ».

Une part de la réponse est peut-être apportée par la présence de réarrangements $\gamma\delta$ soit sur un allèle soit sur des cercles d'excision dans les cellules T $\alpha\beta$. Le fait que les réarrangements $\gamma\delta$ soient majoritairement hors de phase dans les cellules $\alpha\beta$ laisse à penser que les cellules n'ayant pas réussi à réarranger correctement leurs gènes $TCRD$ et $TCDG$

peuvent être « sauvées » en s'engageant dans la voie $\alpha\beta$ (Livak et al., 1995). Ces constatations jouent plus en faveur d'un précurseur commun influencé par des récepteurs et leurs signaux.

L'étude de l'influence du pré-TCR sur le commitment semble pertinente. En effet, le rôle du pré-TCR est important pour le lignage $\alpha\beta$ (voir sélection β). D'autre part le pré-TCR est exprimé en même temps que le TCR $\gamma\delta$ dans la même population cellulaire (les DN3). La première suggestion de l'implication du pré-TCR dans la divergence de lignage est apportée par l'étude de Fehling et al en 1995. La souris pT $\alpha^{-/-}$, qui ne peut exprimer de pré-TCR voit son nombre de lymphocyte T $\gamma\delta$ augmenté de 3 à 10 fois (Fehling et al., 1995). Le signal pré-TCR pousse donc les cellules dans la voie $\alpha\beta$. Cependant, ce rôle est remis en question lorsque Dudley démontre que les réarrangements β sont fréquents dans les LT $\gamma\delta$ périphériques et que 70% d'entre eux sont en phase et productifs (Dudley et al., 1995). Cette proportion nettement supérieure au 33% statistique suggère donc une sélection positive des réarrangements β en phase dans les LT $\gamma\delta$. Ce pourcentage est revue à la baisse par l'étude de Mertsching en 1997 (42%) (Mertsching et al., 1997). La question n'est donc pas claire probablement car ces études sont réalisées dans des populations cellulaires hétérogènes. Pour tenter de déterminer plus précisément le rôle du pré-TCR Aifantis et al ont comparé, par single cell PCR, la proportion de réarrangements TCRB en phase dans les lymphocytes $\gamma\delta$ entre les souris sauvages et pT $\alpha^{-/-}$ (Aifantis et al., 1998). Cette proportion, 19% chez les souris sauvages, est nettement inférieure à celle retrouvée dans les autres études. En absence de pré-TCR elle monte à 43% démontrant qu'il existe une compétition entre les deux lignages et que le pré-TCR favorise le lignage $\alpha\beta$ au détriment des cellules $\gamma\delta$.

3.5.2. Implication de Notch

Notch a été décrit pour la première fois chez la drosophile. C'est un récepteur transmembranaire qui est activé par liaison à l'un de ses ligands Delta 1, 2, 3 ou Jagged 1 et 2. L'activation conduit au clivage par protéolyse du récepteur ce qui libère le domaine cytoplasmique de Notch-1 (NIC). Ce domaine transloque dans le noyau où il s'hétérodimérise avec le facteur de transcription RBP-J, le convertissant de répresseur en activateur. Une des cibles de Notch-1 est le gène codant pour pT α . Notch-1 et ses ligands sont fortement exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques ainsi que sur les cellules du stroma thymique et de la moëlle. Notch-1 jouerait un rôle dans différents choix de lignage tout au long du développement des lymphocytes T (Robey and Bluestone, 2004).

Notch-1 influence tout d'abord le choix entre lignage T ou B lors de la différenciation des CLPs : la reconstitution de souris avec des progéniteurs de moëlle osseuse surexprimant NIC (la forme activée de Notch-1) s'accompagne d'une inhibition de E2A, un facteur de transcription des LB. Cette inhibition provoque le blocage de la maturation des LB et l'installation de lymphopoïèse T dans la moëlle (Pui et al., 1999). Au niveau du thymus, on observe une augmentation de la population B après induction de la délétion de Notch-1 (Radtke et al., 1999). La différenciation *in vitro* des ETP (Early progéniteurs thymique) en thymocytes est obtenue sur les cellules stromales OP9 exprimant Delta 1 mais pas Jagged 1 (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002). Par contre, dans les deux cas la lymphopoïèse B est bloquée. Le signal délivré par Notch-1 suite à son interaction avec Jagged 1 semble en fait trop faible pour pouvoir induire la différenciation vers le lignage T (Lehar et al., 2005). La différenciation des LT $\alpha\beta$ est normale chez les souris Jagged 2^{-/-}. Ces résultats indiquent que le choix du lignage B/T, si l'on exclut l'hypothèse de l'entrée de progéniteurs déjà restreints à un de ces lignages, est le fruit de l'interaction entre Notch-1 exprimé par les ETPs et de Delta 1 porté par les cellules épithéliales thymiques.

L'inactivation conditionnelle de Notch-1 par la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur de LcK provoque un blocage partiel du développement des LT $\alpha\beta$. Dans ces souris le réarrangement D/J est normal mais les réarrangements V/D-J sont inhibés ce qui provoque un blocage partiel de la transition DN3/DN4 avec une réduction drastique des thymocytes DP et SP. La proportion de DN4 n'exprimant pas de chaîne TCR β intra cellulaire est aussi augmentée par rapport à une souris sauvage. Ces résultats impliquent clairement Notch-1 dans la sélection β . Son rôle majeur à ce niveau semble être le contrôle du réarrangement au niveau du locus TCRB mais un rôle secondaire se dégage de cette étude : Notch-1 pourrait aussi servir à éliminer les cellules DN3 ayant un signal pré-TCR déficient (Wolfer et al., 2002). De façon surprenante, le nombre absolu de LT $\gamma\delta$ ne varie pas en absence de Notch1. Pourtant un rôle de Notch-1 dans la sélection du lignage $\alpha\beta$ aux dépens du lignage $\gamma\delta$ avait été avancé. Chez des souris RAG^{-/-} reconstituées avec un mélange de progéniteurs hématopoïétiques Notch-1^{+/-} et Notch-1^{+/+}, les précurseurs Notch-1^{+/-} produisent 3 fois moins de LT $\alpha\beta$ que les précurseurs Notch-1^{+/+}. Dans la même étude une forme constitutivement active de Notch-1 n'influence pas le nombre de LT $\gamma\delta$ TCR⁺ mais induit l'expression de CD8 et de CD4 en surface de thymocytes $\gamma\delta$. Cette forme active de Notch-1 est aussi capable d'induire le passage au stade DP de thymocyte TCR β ^{-/-} (Washburn et al., 1997). La signalisation Notch est donc capable d'induire un changement de lignage de lymphocytes T engagés dans la voie

$\gamma\delta$ et permet de contourner le checkpoint imposant l'expression d'un pré-TCR à la transition DN/DP. L'étude *in vitro* de Lehar et al. éclaire encore la situation en démontrant qu'au stade DN3 en absence de signal Notch-1/Delta 1, le signal délivré par l'interaction avec Jagged1 favorise le lignage $\gamma\delta$. Les thymocytes DN3 en culture sur stroma OP9-DL1 prolifèrent après avoir reçu un signal pré-TCR (Lehar et al., 2005). L'explication avancée est finaliste et propose une survie à tout prix des DN3 en s'engageant par défaut dans la voie $\gamma\delta$.

In vivo les signaux dispensés par l'interaction de Notch-1 avec ses ligands et les signaux dérivés du pré-TCR ne sont pas dissociés. En cultivant dans les thymocytes DN3 de souris RAG-2^{-/-} exprimant un transgène TCRB sur la lignée stromale OP9 ou OP9-DL1, Ciofani et al. ont démontré que la sélection β était possible uniquement en présence de Delta 1. De la même manière la reprise de la différenciation des thymocytes dans les souris RAG-2^{-/-} médiée par l'engagement des CIC avec un anti CD3 ϵ est bloquée par un inhibiteur de la presenilina qui empêche le clivage de Notch et donc son activation. Cette étude démontre donc qu'une coopération étroite entre les signaux délivrés par le pré-TCR et Notch-1 est nécessaire à la différenciation correcte des thymocytes (Ciofani et al., 2004).

3.5.3. Finalisation de l'engagement dans la voie LT $\alpha\beta$ par le réarrangement de δ Rec1.

Nous avons vu précédemment que jusqu'à 42% des thymocytes $\gamma\delta$ possèdent un réarrangement TCRB en phase. Deux études récentes suggèrent que c'est la force du signal TCR $\gamma\delta$ ou pré-TCR qui influence l'engagement dans la voie $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (Haks et al., 2005; Hayes et al., 2005). Les thymocytes qui expriment un TCR $\gamma\delta$ capable d'induire un signal fort s'engage dans la voie $\gamma\delta$. En cas de signal insuffisant, le thymocyte pourrait achever de réarranger ses gènes TCRB et exprimer un pré-TCR. L'intensité de la signalisation issue du pré-TCR est faible et il existe une compétition entre les deux lignages. Cependant un mécanisme pourrait favoriser le lignage TCR $\alpha\beta$ aux dépens du lignage TCR $\gamma\delta$. En effet un événement de réarrangement particulier pourrait pousser les thymocytes vers la voie $\alpha\beta$ une fois la sélection β effectuée même en cas de signal faible en empêchant toute expression d'un réarrangement TCR δ . Ce réarrangement fait intervenir un élément appelé Delta deleting element (δ Rec-1) et le pseudogène AJ61. Il a été mis en évidence à haute fréquence dans les thymocytes DP chez l'homme sur les deux allèles (de Villartay et al., 1988). En effet 80% des LT $\alpha\beta$ humains présentent une délétion des deux allèles dont 68% sont médiée par le réarrangement de δ Rec1 avec AJ61 (Verschuren et al., 1997). Ce réarrangement excise

complètement les gènes TCRD. Il empêche donc toute transcription ultérieure d'un réarrangement TCRD productif. Cet élément est conservé entre l'homme et la souris (Hockett et al., 1989) mais sa fréquence de recombinaison, estimée entre 8% et 14%, est nettement plus faible chez la souris (Pido-Lopez et al., 2002; Sempowski et al., 2002). L'analyse par southern blot de ces réarrangements montre que AJ61 n'est pas le seul accepteur pour δ Rec-1 chez l'homme comme chez la souris. La diversité combinatoire semble cependant plus élevée chez la souris (Hockett et al., 1989). Chez l'homme ce réarrangement est restreint aux lymphocytes $\alpha\beta$ et se déroule à la transition DN/DP avant l'initiation des réarrangements ADV/AJ (Okamoto et al., 2002). Tous ces résultats suggèrent donc qu'au moins chez l'homme ce réarrangement extrêmement fréquent pourrait finaliser l'engagement dans la voie $\alpha\beta$. Son rôle dans le modèle stochastique serait de favoriser le réarrangement ADV/AJ en rapprochant les partenaires de recombinaison.

Les cercles d'excision (TRECs) constituent en fait un formidable outil d'analyse de la fonctionnalité thymique. En effet les TRECs portant la JS formée au cours de la recombinaison V(D)J sont inertes et ne se répliquent pas au cours de la division cellulaire. On constate en effet une dilution des TRECs en culture lors de la prolifération des cellules. Leur durée de vie est élevée puisqu'on peut retrouver des TRECs plus de 20 ans après thymectomie (Sempowski et al., 2001; Storek et al., 2003). Ces propriétés font des TRECs δ Rec-1/AJ61 un excellent marqueur de la production thymique et des thymocytes récemment émigrés en périphérie n'ayant pas encore subi de prolifération homeostatique (Douek et al., 1998).

4. LE STRESS RADIATIF ET LA DIFFERENCIATION

Lors d'expériences de reconstitution, les souris récipiendaires souvent immunodéficientes (SCID, RAG) sont soumises à une irradiation globale afin d'éliminer les cellules impliquées dans le rejet de greffe (NK, macrophage, DC) et/ou « faire de la place » pour les cellules souches du greffon. Suite à l'irradiation de souris RAG^{-/-} et SCID des thymocytes DP provenant de l'hôte ont été détectés. Des études spécifiques afin de déterminer les conséquences de l'irradiation dans ces souris ont été entreprises.

4.1. Souris SCID et différenciation radio-induite

La recombinaison V(D)J implique des protéines ubiquitaires de réparation lors de la phase de résolution des coupures introduites par la recombinaise. La mutation de DNA-PKcs dans les souris SCID s'accompagne d'un blocage des réarrangements quelque soit le locus observé. En absence de réarrangement des gènes TCRB, la sélection β ne peut avoir lieu provoquant ainsi le blocage de la différenciation au stade DN3. L'exposition de souris SCID aux radiations ionisantes permet la restauration de la différenciation (Danska et al., 1994; Murphy et al., 1994). Quatre semaines après une irradiation de 1,5 Gy la population DP représente 70% des thymocytes. Il n'y a pas de génération de lymphocytes SP. La reprise de la différenciation s'accompagne d'une augmentation de la cellularité thymique qui passe progressivement de 1 million à 20 millions en 4 semaines (Danska et al., 1994; Wang et al., 1999b). L'irradiation induit un stress oxydatif et est connue pour activer de nombreuses kinases. On pourrait donc penser que l'effet observé sur les SCID pourrait être dû à l'activation de protéines impliquées dans la voie de signalisation du pré-TCR. Cependant l'utilisation d'un agent induisant des coupures doubles brins (la bleomycine) permet aussi la reprise de la différenciation bien que de façon moins efficace que l'irradiation (Danska et al., 1994). D'autre part l'irradiation permet la restauration transitoire du réarrangement β , l'expression d'une chaîne TCR β intracellulaire et finalement l'expression en surface du pré-TCR. Ces réarrangements sont normaux et la reprise de la différenciation ainsi que la prolifération sont donc explicables par la restauration de la sélection β (Danska et al., 1994; Livak et al., 1996). Le niveau de CD3 ϵ et δ est cependant plus faible que la normale tandis que l'expression de CD3 γ est augmentée. Ce défaut de stœchiométrie du pré-TCR empêche une mobilisation correcte du calcium dans les thymocytes suite à la stimulation par anti-CD3 ϵ

expliquant peut être la proportion plus faible que la normale de DP dans le thymus (Murphy et al., 1994).

Le réarrangement des gènes TCRD et TCRG est aussi induit par l'irradiation γ des souris SCID (Bogue et al., 1996; Livak et al., 1996). Le réarrangement TCRD radio-induit est cependant beaucoup moins diversifié que les réarrangements TCRB. Par contre la plus grande partie des gènes TCRA ne sont pas réarrangés et l'on retrouve une grande quantité d'extrémités codantes en épingle à cheveux (Livak et al., 1996; Zhu et al., 1996; Zhu and Roth, 1995). Contrairement aux autres loci TCR, l'ouverture de l'épingle à cheveux médiée par l'irradiation n'a donc pas lieu au niveau des gènes TCRA. Il a été proposé que l'effet de l'irradiation ne dure pas assez longtemps pour permettre le réarrangement des gènes TCRA. Seuls les quelques réarrangements TCRA initiés au stade DN3 pourraient être résolus. Deux études contredisent partiellement cette hypothèse.

L'étude de Wang et al prouve que le transfert adoptif de moelle osseuse de SCID irradiée dans des souris RAG-2^{-/-} x NK⁻ permet de restaurer la différenciation de manière plus efficace que l'irradiation globale d'une souris SCID. En effet des thymocytes SP CD4⁺ sont identifiables dans 3 souris sur 5 et en plus de réarrangements TCRB, TCRG et TCRD on retrouve quelques réarrangements TCRA (Wang et al., 1999a). Les précurseurs ne présentant pas d'intermédiaires de réarrangement sous la forme d'extrémités codantes en épingle à cheveux au moment de l'irradiation sont donc capables d'effectuer le réarrangement complet de leurs gènes après irradiation.

La seconde étude menée par Zhu montre qu'après une première irradiation de souris SCID, de nombreuses extrémités codantes en épingle à cheveux de gènes TCRA sont retrouvées (Zhu et al., 1996). Cependant une seconde dose d'irradiation ne permet pas de résoudre ces extrémités et aucune augmentation du niveau de réarrangement des gènes TCRA n'est observée. La plus forte radiosensibilité des thymocytes DP ayant initié le réarrangement TCRA pourrait cependant masquer l'effet de la seconde irradiation.

Toutes ces études ne permettent pas de savoir si l'irradiation recrute un système de réparation complètement différent de celui impliqué habituellement dans le NHEJ. Suite à l'irradiation de souris « slip » inactivées pour DNA-PKcs, il est observé une restauration de la différenciation des thymocytes sans augmentation de la cellularité accompagnée du sauvetage du réarrangement alpha (Wang et al., 1999b). Dans ce modèle, l'effet de l'irradiation ne nécessite donc pas l'activité de DNA-PK que ce soit pour signaler les dommages de l'ADN ou pour résoudre l'épingle à cheveux. La génération de DP suite à l'irradiation des souris

Ku80 déficientes (Nussenzweig et al., 1997) exclu aussi le rôle de ce complexe dans l'induction de la différenciation radio-induite.

Le supresseur de tumeur p53 joue un rôle majeur dans l'orchestration de la réponse à un stress génotoxique. L'apoptose des thymocytes suite à l'irradiation est notamment strictement p53 dépendante (Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993). De plus p53 est activée par les cassures radio-induites de l'ADN (Nelson and Kastan, 1994) et provoque l'arrêt en phase G1 ou l'apoptose selon le type cellulaire (Levine, 1997; Vousden and Lu, 2002). Cette protéine pourrait jouer le rôle de senseur des dommages de l'ADN en complément ou en remplacement de DNA-PK, suite à l'irradiation des souris SCID. Chez les souris SCID x p53^{-/-} ni la recombinaison ni la différenciation ne sont restaurées suite à l'irradiation (Bogue et al., 1996). p53 est donc bien impliquée dans la finalisation des réarrangements TCRB.

L'irradiation augmente l'incidence d'apparition des lymphomes thymiques chez les souris SCID (Lieberman et al., 1992; Murphy et al., 1994). Chez l'homme le lymphome est souvent associé à des translocations chromosomiques impliquant les gènes TCR. Williams et al ont prouvé que ces transformations sont liées à l'activité de clivage des protéines RAGs puisque qu'il n'y a plus de développement de thymome dans les souris SCID x RAG-2^{-/-} après irradiation (Williams et al., 2001).

Il est important de noter pour finir que l'irradiation n'a pas d'effet sur la différenciation et la recombinaison des gènes d'Ig dans les LB (Danska et al., 1994). Les voies de réponses à l'irradiation activées ne sont peut être pas les mêmes et l'effet du signal pré-TCR restauré par l'irradiation pourrait être plus important que ce que l'on pensait.

4.2. Souris RAG^{-/-} et différenciation radio-induite

Alors que dans les souris SCID le rôle du pré-TCR et de la sélection β semblaient être nécessaires, l'induction de la différenciation jusqu'au stade DP est aussi obtenue suite à l'irradiation de souris RAG^{-/-}. L'importance de la quantité de DP formée dépend directement de la dose d'exposition et l'effet maximum est obtenu 3 semaines après irradiation. Dans tous les cas le réarrangement des gènes TCRB n'est pas restauré et l'irradiation semble ici mimer le signal pré-TCR (Guidos et al., 1995; Zuniga-Pflucker et al., 1994). Comme dans les souris SCID l'effet est restreint aux thymocytes. La différenciation des LB n'est pas restaurée. La très faible progression du stade DN au stade DP (9%) dans les souris RAG^{-/-} Lck^{-/-} confirme l'effet inducteur de l'irradiation sur la cascade de signalisation normalement activée par le pré-TCR (Wu et al., 1996). Dans cette étude l'utilisation d'un anticorps anti CD3 au lieu de l'irradiation provoque le même faible effet sur la différenciation des thymocytes confirmant la

similitude entre les voies de signalisations activées par l'irradiation et les voies provenant du CIC.

L'irradiation des souris RAG provoque des mutations ponctuelles de p53 dans plus de 40% des thymocytes. De plus, des formes mutées de la protéine sont trouvées. Dans les souris non exposées, p53 empêcherait le passage au stade DP en absence de l'expression d'une chaîne β fonctionnelle. La mutation radio-induite de p53 permettrait la progression des thymocytes DN au stade DP (Jiang et al., 1996). Le passage spontané de thymocytes du stade DN au stade DP dans les souris RAG et SCID dans lesquelles p53 est inactivée confirme cette hypothèse (Guidos et al., 1996; Zuniga-Pflucker et al., 1994). Chez les souris SCID l'inactivation de p53 parvient en plus à restaurer partiellement la recombinaison V(D)J. Ces résultats contredisent ceux obtenus par Bogue et al qui démontraient la nécessité de p53 pour la restauration de la recombinaison et de la différenciation suite à l'irradiation des souris SCID (Bogue et al., 1996). Probablement que les mécanismes mis en place en réponse à l'irradiation diffèrent de ceux permettant le passage de thymocytes au stade DP suite à l'inactivation de p53.

Le rôle opposé de p53 dans la réponse à l'irradiation chez les souris SCID et RAG permet d'envisager l'existence d'au moins deux voies de réponses à l'irradiation : une p53 dépendante et une p53 indépendante.

5. OBJECTIFS DE MA THESE.

Plusieurs études ont montré qu'une irradiation peut entraîner une restauration transitoire de la différenciation des thymocytes immatures DN qui n'expriment pas de pré-TCR. L'exposition de souris SCID ou de souris RAG^{-/-} à une seule dose de radiations ionisantes induit le développement de thymocytes DP. Chez les souris SCID, ce phénomène résulte probablement de la complétion des réarrangements TCRB qui permet l'expression d'un pré-TCR. Chez les souris RAG^{-/-}, la différenciation radio-induite des thymocytes immatures se déroule en absence de réarrangement des gènes TCRB mais nécessite les voies de transduction des signaux d'activation du pré-TCR. L'analyse du rôle de p53 dans la différenciation radio-induite des thymocytes dans ces deux modèles produit des résultats contradictoires : alors que la restauration du développement et des réarrangements TCRB nécessitent l'activation de p53 chez la souris SCID, il semble au contraire que l'inactivation de p53 soit nécessaire à la différenciation radio-induite chez les souris RAG^{-/-}. Afin de déterminer si p53 joue ou non un rôle dans ce phénomène, nous avons analysé la différenciation radio-induite des thymocytes immatures chez les souris CD3ε^{Δ5/Δ5}. Ces souris offrent le double avantage de posséder des systèmes de réparation de l'ADN fonctionnels, contrairement aux souris SCID, et de pouvoir réarranger leurs gènes TCR, contrairement aux souris RAG^{-/-}. Nous avons donc généré des souris CD3ε^{Δ5/Δ5} déficientes en p53 et comparé la réponse à l'irradiation de souris CD3ε^{Δ5/Δ5} et CD3ε^{Δ5/Δ5} x p53^{-/-}. Ces travaux nous ont conduit à comparer la réponse à l'irradiation de différentes lignées de souris où le développement des lymphocytes T est bloqué au stade DN3 afin de déterminer la nécessité du pré-TCR ou des CIC dans la réponse à l'irradiation. Nous avons ainsi pu caractériser les voies de signalisation pré-TCR nécessaire à la différenciation des thymocytes DN et montrer leur activation en réponse à l'irradiation.

Dans les souris SCID l'irradiation restaure le réarrangement des gènes TCRB, TCRD et TCRG probablement en activant des systèmes de réparations de l'ADN aspécifiques qui vont résoudre les extrémités codantes en épingle à cheveux générées par la recombinaise avant l'irradiation. Les réarrangements TCRA peu présents au stade DN3 ne sont pas restaurés chez la souris SCID. Le réarrangement des gènes TCRA après irradiation de souris CD3ε^{Δ5/Δ5} a donc été analysé afin de déterminer si l'irradiation pouvait fournir tous les signaux nécessaires au recrutement de la machinerie de recombinaison V(D)J et ainsi induire le réarrangement TCRA. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation du réarrangement des gènes TCRA suite à l'irradiation de souris CD3. Cette induction a été montrée par l'analyse de l'évolution de la quantité de TRECs. Le taux de modification des JS

portées par les TRECs ne varie pas de manière significative entre les JS formée suite à l'irradiation ou lors du réarrangement des mêmes gènes chez une souris sauvage. Contrairement au dogme de la littérature, une fraction significative des JS formées dans les souris sauvages présente des modifications et ce que quel que soit l'évènement de réarrangement considéré. L'implication de ces résultats fait l'objet du 3ème article. L'utilisation de la diversité combinatoire et structurelle des JS mise en évidence lors de cette étude nous a aussi permis de proposer dans le cadre d'un brevet, une méthode simple permettant la mise en évidence de la clonalité d'une population de lymphocytes. Les modifications des JS étant clairement un processus normal inhérent au mécanisme de la recombinaison V(D)J, nous avons cherché quel pouvait être le rôle dans la formation des JS, des protéines de réparation et de maintien de la stabilité du génome décrites comme associées aux extrémités signal. D'autre part des tests *ex vivo* de fidélité de réparation de plasmides sont utilisés pour mettre en évidence des défauts de réparation liés à des mutations de la protéine BRCA1. Ce système *in vitro* possède de fortes analogies avec la formation des jonctions signal par circularisation de l'ADN excisé. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de mutations de protéines de réparation et de maintien de la stabilité du génome sur la structure des JS (résultats complémentaires).

Tous ces travaux amènent une meilleure compréhension des événements de signalisation associés à la transition DN/DP. L'étude de la structure des JS nous a d'autre part permis de préciser le mécanisme de la recombinaison V(D)J en clarifiant le rôle de protéines ubiquitaires retrouvées au niveau des extrémités signal qui sont classiquement associées à d'autres voies de réparation que la voie NHEJ.

RESULTATS

ARTICLE I

p53-dependent and p53-independent pathways for radiation-induced immature thymocyte differentiation.

Candéias SM, Mancini SJ, Touvrey C, Borel E, Jouvin-Marche E, Marche PN

Oncogene. 2004;23(10):1922-9

ARTICLE I

p53-dependent and p53-independent pathways for radiation-induced immature thymocyte differentiation.

Candéias SM, Mancini SJ, Touvrey C, Borel E, Jouvin-Marche E, Marche PN
Oncogene. 2004;23(10):1922-9

Chez les souris déficientes pour l'expression du pré-TCR ($RAG^{-/-}$, $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ ou SCID), la maturation des thymocytes est bloquée au stade DN3 (Danska et al., 1996; DeJarnette et al., 1998; Malissen et al., 1995; Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992; Wang et al., 1998). En absence des signaux de survie et de prolifération issus du pré-TCR et il n'y a pas de développement de LT DP. Les thymocytes DN sont éliminés par apoptose p53 dépendante (Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993) : l'inactivation de p53 permet d'ailleurs la reprise de la différenciation des thymocytes (Guidos et al., 1996; Zuniga-Pflucker et al., 1994). L'irradiation des souris $RAG^{-/-}$ ou SCID permet aussi d'induire cette survie. Comme p53 est activée par l'irradiation, son rôle dans la différenciation radio-induite a été étudié. Après irradiation de souris $RAG-2^{-/-}$, des mutations de p53 ont été détectées (Jiang et al., 1996). Ces mutations de p53 permettraient la reprise de la maturation en absence d'expression d'une chaîne TCR β . A l'inverse chez les souris SCID, la reprise de la différenciation suite à une irradiation gamma nécessite la présence de p53 (Bogue et al., 1996). Cette différence pourrait venir de l'incapacité des souris SCID à répondre correctement à un stress génotoxique ou de la différence de la dose d'irradiation employée. L'irradiation restaure le réarrangement TCRB, TCRD et TCRG chez les souris SCID et permettrait l'expression d'un pré-TCR et la délivrance aux thymocytes DN des signaux de survie ce qui expliquerait la progression au stade DP (Bogue et al., 1996; Danska et al., 1994; Livak et al., 1996). Le réarrangement TCRA n'est par contre pas restauré. Afin de déterminer si la signalisation pré-TCR est réellement requise lors de la différenciation radio-induite, nous avons analysé la réponse à l'irradiation de souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$. Nous avons également étudié dans ce modèle le rôle potentiel de p53 dans ce phénomène ainsi que l'effet de l'irradiation sur le réarrangement

TCRA puisqu'à la différence des souris SCID et RAG^{-/-}, les souris CD3ε^{Δ5/Δ5} possèdent une machinerie de recombinaison parfaitement fonctionnelle.

L'irradiation des souris CD3ε^{Δ5/Δ5} permet comme chez les souris RAG-2^{-/-} la reprise de la différenciation jusqu'au stade DP. Trois semaines après une irradiation de 6 Gy, les LT DP représentent en moyenne 45% des thymocytes. Au niveau moléculaire la maturation des thymocytes est accompagnée d'une induction des réarrangements TCRA. Ces réarrangements sont aussi variés que dans une souris sauvage. De manière intéressante les gènes TCRA formés sont aussi transcrits. L'arrêt de la progression de la différenciation au stade DP est donc probablement dû à l'incapacité de ces souris à assembler et exprimer en surface un complexe TCR.

Nous avons ensuite étudié le rôle controversé de p53 dans la différenciation radio-induite. L'application d'une seconde dose d'irradiation chez les souris CD3ε^{Δ5/Δ5} provoque l'apoptose des lymphocytes DP générés suite à la première dose d'irradiation 3 semaines avant. L'apoptose des thymocytes DP dépendant strictement de p53 cela prouve que p53 est toujours fonctionnelle dans les DP radio-induits. L'inactivation de p53 n'est donc pas nécessaire à l'induction de la différenciation chez les souris CD3ε^{Δ5/Δ5} à l'inverse de ce qui avait été montré chez les souris RAG-2^{-/-}. D'autre part l'irradiation de souris CD3ε^{Δ5/Δ5} x p53^{-/-} permet aussi la génération de thymocytes DP. La fréquence nettement plus élevée et la cinétique d'apparition plus rapide des DP que chez les souris CD3ε^{Δ5/Δ5} x p53^{-/-} non irradiées montrent bien que c'est l'irradiation qui est à l'origine de ce phénomène. Chez les souris CD3ε^{Δ5/Δ5} la protéine p53 n'est donc pas requise pour la réponse à l'irradiation ce qui n'est pas le cas chez les souris SCID. De plus seule les souris CD3ε^{Δ5/Δ5} x p53^{-/-} sont sensibles aux faibles doses d'irradiation (1,5 Gy). Il existe donc une voie de différenciation p53 indépendante qui n'existe pas chez les souris SCID.

L'ensemble de nos résultats montre que chez les souris CD3ε^{Δ5/Δ5} l'irradiation γ induit la différenciation des thymocytes DN jusqu'au stade DP et provoque le réarrangement des gènes TCRA et leurs transcription. La sensibilité, la cinétique et l'importance de la réponse à l'irradiation dépendent de l'expression du suppresseur de tumeur p53. La réponse à l'irradiation est donc médiée par deux voies distinctes p53 dépendante et p53 indépendante.

p53-dependent and p53-independent pathways for radiation-induced immature thymocyte differentiation

Serge Michel Candéas^{*1}, Stéphane Jean Charles Mancini^{1,2}, Cédric Touvrey¹, Eve Borel¹, Evelyne Jouvin-Marche¹ and Patrice Noël Marche¹

¹Laboratoire d'Immunochimie, Commissariat à l'Energie Atomique-Grenoble, Département Réponse et Dynamique Cellulaire, INSERM U548, Université Joseph Fourier, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble, France

The pre-T-cell receptor (TCR) delivers essential survival/differentiation signals to the developing thymocytes. Severe combined immunodeficient (SCID) and recombination-activating gene (RAG)-deficient mice are unable to assemble antigen receptor genes, and therefore cannot express a pre-TCR. Consequently, T lymphocyte differentiation is arrested at an early stage in the thymus of these animals, and immature thymocytes are eliminated through apoptotic processes. This maturation arrest can be relieved and thymocyte differentiation rescued after the exposure of these mice to whole-body γ -irradiation. Whereas the promotion of immature thymocyte survival/differentiation was shown to require p53 activity in irradiated SCID mice, it was suggested, on the other hand, that p53 activation prevents immature thymocytes survival/differentiation in irradiated RAG-deficient mice. However, SCID mice have impaired responses to ionizing radiation. In this paper, we analysed p53 requirement in radiation-induced thymocyte differentiation in CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ mice, where pre-TCR deficiency also results in an early block of lymphocyte development. Our results show at the cellular and molecular levels that, in this DNA repair-proficient model, irradiation-induced thymocyte differentiation proceeds either by a p53-dependent or by a p53-independent pathway, which differ in their sensitivity to the radiation dose delivered.

Oncogene (2004) 23, 1922–1929; doi:10.1038/sj.onc.1207320
Published online 2 February 2004

Keywords: p53; ionizing radiation; T lymphocyte survival; differentiation; DNA-PK

Introduction

The tumor suppressor p53 is activated by – and plays a central role in the orchestration of the cellular response to – genotoxic stress (Lakin and Jackson, 1999; Sionov

and Haupt, 1999). Activated p53 is a transcription factor that exerts its functions through the activation and repression of numerous target genes. The outcome is either cell cycle arrest, to allow repair of DNA damage, or induction of apoptosis of damaged cells. The type and extent of p53-dependent response induced by ionizing radiation (IR) in mice depend on the target cells and tissues. For example, the p53-dependent trans-activation of *p21^{waf}* gene expression is far more important in the spleen than in the lung of irradiated animals (Bouvard *et al.*, 2000).

In mice, p53 have been proposed to control survival checkpoints during T lymphocyte differentiation (see below). T cells develop in the thymus, which is seeded by bone-marrow-derived precursors throughout life. Their maturation is controlled in part by the sequential rearrangement and expression of their antigenic T-cell receptor (TCR) genes, and can be followed by the regulated expression of various cell surface molecules, including CD4 and CD8. Immature double-negative (DN) thymocytes express neither CD4 nor CD8. They differentiate into CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) cells, which in turn generate CD4⁺8⁺ and CD4⁺8⁺ mature single-positive (SP) thymocytes, which are exported to the periphery. The TCR is a heterodimer composed of α and β chains. The genes coding for these proteins exist in the germ-line as discrete V, D (for the β chain) and J gene segments that must be rearranged by a site-specific recombinase in order to code for a functional protein. TCR β chain genes are rearranged and expressed first in DN thymocytes, where they are expressed on the surface associated with the invariant pT α chain and the CD3 complex to form a pre-TCR. Signaling from the pre-TCR through the CD3 complex results in thymocyte proliferation and differentiation to the DP compartment, where most of the TCR α chain gene rearrangement takes place (von Boehmer *et al.*, 1999). A block at the DN stage is observed in recombination-activating gene (RAG)-deficient mice (Mombaerts *et al.*, 1992; Shinkai *et al.*, 1992), unable to perform V(D)J recombination, or in mice unable to express a pre-TCR because of CD3 complex disruption (Malissen *et al.*, 1995; DeJarnette *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998, 1999). A similar block of maturation is observed in *severe combined immunodeficient (SCID)* mice, which are unable to assemble their TCR genes and

*Correspondence: SM Candéas; E-mail: immuno@dsvsud.cea.fr

²Current address: Ludwig Institute for Cancer research, Chemin des Boveresses 155, 1066 Epalinges, Switzerland.

Received 18 August 2003; revised 10 October 2003; accepted 28 October 2003

have impaired DNA repair mechanisms, owing to a mutation in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) gene (Danska *et al.*, 1996; Araki *et al.*, 1997). In the absence of pre-TCR-derived survival and/or differentiation signals, DN thymocytes are eliminated by apoptosis and DP thymocytes do not develop. The inhibition of apoptosis, either by over-expression of a FADD-dominant negative protein (Newton *et al.*, 2000) or by inactivation of p53 promotes the survival and differentiation of pre-TCR-deficient thymocytes (Bogue *et al.*, 1996; Guidos *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996; Nacht *et al.*, 1996; Haks *et al.*, 1999).

The survival/differentiation of pre-TCR-deficient thymocytes is also induced in irradiated *SCID* (Danska *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1994; Bogue *et al.*, 1996) and *RAG-2*^{-/-} mice (Zuniga-Pflucker *et al.*, 1994; Guidos *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1996), following exposure to a single dose of IR. As IR activates p53 (Nelson and Kastan, 1994), its potential implication in IR-induced immature thymocyte differentiation was sought. Mutations in the p53 gene and mutated forms of the p53 protein were found in irradiated *RAG-2*^{-/-} thymocytes, suggesting that IR-induced p53 inactivation in immature thymocytes was responsible for their survival/differentiation (Jiang *et al.*, 1996). On the other hand, p53 expression was found to be necessary for the rescue of DP thymocyte development in *SCID* mice suggesting that p53, once activated in response to irradiation, controls DP thymocyte generation (Bogue *et al.*, 1996). This discrepancy may result from the impaired ability of *SCID* mice to respond to genotoxic stress, or from the fact that IR doses used in both studies were very different.

In this study, we analysed the requirement for p53 activation or inactivation in IR-induced immature thymocyte differentiation and TCR gene expression in *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice, where T lymphocyte development is arrested at the DN stage, as in *SCID* and *RAG-2*^{-/-} mice, because the absence of CD3 complex expression prevents pre-TCR assembly (Malissen *et al.*, 1995). However, unlike *SCID* mice, *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice possess functional DNA repair mechanisms and, unlike *SCID* and *RAG-2*^{-/-} mice, they are V(D)J recombination proficient. Our results show that γ-irradiation induces thymocyte differentiation to the DP stage, including the rearrangement and transcription of the TCRA genes in *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice. In addition, our analysis demonstrates that in mice with a functional DNA-PK complex, IR induces thymocyte survival/differentiation both by a p53-dependent and by a p53-independent pathway, which differ in their IR sensitivity.

Results

γ-irradiation induces differentiation of immature *CD3ε*^{Δ5/Δ5} thymocytes, including rearrangement and transcription of TCRA genes

T-cell development is arrested at the DN stage of differentiation in CD3-deficient *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice.

However, DP thymocytes are readily detected in the thymus of irradiated *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice 3 weeks after exposure to a single dose (6 Gray (Gy)) of whole-body ¹³⁷Cs irradiation (Figure 1a). Irradiation first induces a five- to six-fold reduction of thymic cellularity, followed by a slow recovery during the subsequent weeks (Table 1). At 3 weeks postirradiation, thymic cellularity have not yet reached unirradiated levels. CD4 and CD8

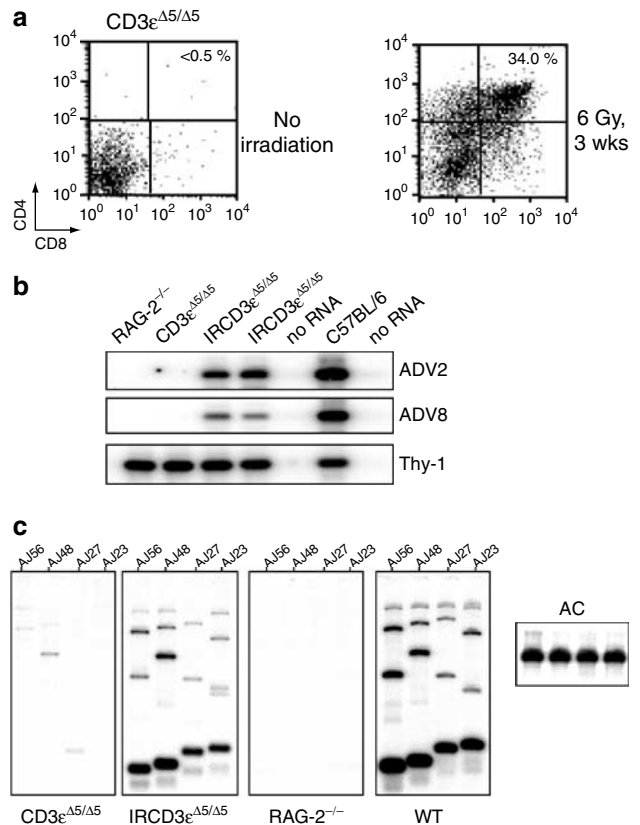


Figure 1 IR exposure induces differentiation of immature thymocyte, including the rearrangement and transcription of TCRA genes, in *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice. (a) Thymocytes of control and irradiated (6 Gy, 3 weeks) *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice were analysed by FACS for the expression of CD4 and CD8 molecules. The percentage of DP thymocytes in irradiated mice is indicated in the top right quadrant. (b) Rearranged TCRA gene transcription was analysed by RT-PCR in thymocyte cDNA samples prepared from unirradiated *RAG-2*^{-/-} and *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice, from two different irradiated (6 Gy, 3 weeks) *CD3ε*^{Δ5/Δ5} mice and a wt *C57BL/6* control animal. Transcription of TCRα chain genes using ADV2 (top) and ADV8 (middle) gene families are shown. *RAG-2*^{-/-} thymocyte cDNA is used as a negative control, as no TCR rearrangement takes place in these cells. The amplification of Thy-1 mRNA (bottom) is used as cDNA input control. No RNA: RNA was omitted during cDNA synthesis. (c) PCR analysis of ADV2-AJ rearrangement on thymocyte genomic DNA. For each sample, four PCR reactions were performed for 26 cycles with primers specific for ADV2 and AJ56, AJ48, AJ27 or AJ23 genes. This protocol allows the linear amplification of ADV genes recombined with multiple contiguous AJ genes in each reaction (Mancini *et al.*, 2001). The right panel shows the amplification of a nonrearranging segment from the TCRA constant region gene (AC) from each sample, as a control for DNA input. *RAG-2*^{-/-} and *C57BL/6* thymocyte DNA are used as a negative and positive control, respectively

Table 1 DP thymocyte development in irradiated CD3-deficient mice

Treatment	Cells/thymus ^a ± s.d. (× 10 ⁶)	% DP cells ^b ± s.d.	N DP cells ^c ± s.d. (× 10 ⁶)
<i>CD3^{Δ5/Δ5} mice</i>			
None (16)	10.00 ± 4.13	<0.5	<0.05
6 Gy, 24 h (10)	1.91 ± 0.84	ND	ND
6 Gy, 1 week (3)	3.22 ± 0.90	<0.5	<0.05
6 Gy, 2 weeks (12)	2.98 ± 1.42	10.61 ± 8.25	0.34 ± 0.33
6 Gy, 3 weeks (12)	7.87 ± 3.89	45.62 ± 15.49*	3.95 ± 3.34
<i>p53^{-/-}CD3^{Δ5/Δ5} mice</i>			
None (8)	12.23 ± 3.74	<0.5	0.051 ± 0.015
6 Gy, 24 h (7)	8.68 ± 2.81	ND	ND
6 Gy, 1 week (4)	3.38 ± 1.14	0.76 ± 0.10	<0.05
6 Gy, 2 weeks (11)	11.69 ± 3.86	28.77 ± 21.19**	3.97 ± 3.95
6 Gy, 3 weeks (8)	25.01 ± 13.07	42.77 ± 22.57 ^{NS}	12.91 ± 12.65

^aViable cells were numerated by acridin orange/ethidium bromide exclusion under UV light. ^bThe percentage of CD4⁺8⁺ thymocytes was determined by FACS analysis. ^cAbsolute number of DP thymocytes was calculated from the percentage of DP thymocytes and the total number of cells per thymus. ND: not done. Numbers in parentheses represent the number of mice analysed for each point. **P* < 0.02, and ***P* < 0.05 when compared to 2 weeks irradiated CD3^{Δ5/Δ5} mice. NS: not statistically different from 2 weeks irradiated p53^{-/-}CD3^{Δ5/Δ5} mice (*P* = 0.137) and from 3 weeks irradiated CD3^{Δ5/Δ5} mice (*P* = 0.7).

expression on thymocytes become significant (above 0.5%) only 2 weeks after irradiation. The proportion of DP thymocytes increases from 2 to 3 weeks post-treatment, when it is maximal. Similar results were obtained whether irradiation was given to pups, within the first week after birth, or to adult animals (data not shown). We also observed the appearance of thymocytes with a CD4⁺CD8⁻ (upper left quadrant) or, to a lesser extent, CD4⁺8⁺ SP (lower right quadrant) phenotype. These cells are immature SP thymocytes, an intermediate stage of differentiation between the DN and DP compartments (Hugo *et al.*, 1991). Indeed, they are TCR-negative, because of the absence of CD3 complex expression, and they are induced into apoptosis following a second exposure to radiation, whereas mature SP thymocytes found in a wild-type (wt) thymus are TCR⁺ and are more resistant than DP thymocytes to IR-induced apoptosis (see below, Figures 4 and 5).

TCRα chain gene transcription, which is massively induced during the DN/DP transition in wt mice, have never been found in CD3^{Δ5/Δ5} mice (Figure 1b) (Malissen *et al.*, 1995; Gallagher *et al.*, 1998; Mancini *et al.*, 2001), despite the fact that the TCRA genes, coding for this chain, are rearranged at a low level in these mice (Mancini *et al.*, 2001). To determine whether IR also rescues rearranged TCRA gene transcription, cDNA prepared from unirradiated and irradiated CD3^{Δ5/Δ5} thymocytes was amplified with oligonucleotide primers specific for the ADV2 and ADV8 gene families and the AC region. Rearranged TCRA gene transcripts were detected in irradiated, but not control CD3^{Δ5/Δ5} animals (Figure 1b). Finally, we also analysed TCRA gene rearrangement at the genomic DNA level in irradiated CD3^{Δ5/Δ5} mice. To this end, we used a recently developed PCR assay that allows the detection of multiple rearrangements involving a given ADV gene or gene family with up to four contiguous AJ genes in a single reaction. With four reactions with primers specific for ADV2 on the one hand and for four different AJ

genes (AJ56, AJ48, AJ27, AJ23) on the other, we can amplify up to 16 ADV2/AJ combinations in C57BL/6 thymocytes. As expected, none are detected in V(D)J recombination-deficient RAG-2^{-/-} mice (Figure 1c, see Mancini *et al.*, 2001 for more details). The amplification of genomic DNA prepared from unirradiated and irradiated CD3^{Δ5/Δ5} total thymocytes clearly shows that more bands are present after irradiation, and they are more intense than in control animals. Thus, multiple ADV2/AJ rearrangements are present in irradiated thymocytes, whereas they are rare in unirradiated samples (Figure 1c).

Altogether, these results show that IR exposure of CD3^{Δ5/Δ5} mice promotes immature thymocyte survival and differentiation, including rearrangement and transcription of TCRA genes. These mice therefore represent a suitable model to analyse p53 involvement in this phenomenon.

p53 activation is not required for IR-induced thymocyte differentiation

p53-deficient CD3^{Δ5/Δ5} animals were generated. As for other models (Bogue *et al.*, 1996; Guidos *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996; Nacht and Jacks, 1998; Haks *et al.*, 1999), the genetic inactivation of p53 in CD3^{Δ5/Δ5} mice resulted in some spontaneous immature thymocyte differentiation to the DP stage in older mice. However, in young (<6 weeks) p53^{-/-}CD3^{Δ5/Δ5} double-deficient animals, T-cell development is still blocked at the DN stage (Figure 2). To analyse IR-induced T-cell differentiation without interference from 'spontaneous' DP development resulting from p53 inactivation, p53^{-/-}CD3^{Δ5/Δ5} animals were irradiated within a week from birth and analysed before 4 weeks of age.

DP thymocytes are generated in response to γ-irradiation in the thymus of p53-deficient CD3^{Δ5/Δ5} mice, where they reach a maximum frequency of 45%, a level similar to that obtained in p53^{+/+}CD3^{Δ5/Δ5} animals

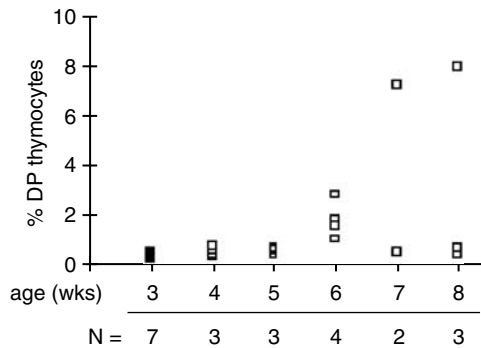


Figure 2 ‘Spontaneous’ DP thymocyte development in unirradiated $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice. Thymocytes from $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice at different ages (from 3 to 8 weeks) were prepared and labeled with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. The percentage of DP thymocytes in each animal was determined by FACS analysis. Each symbol represents one animal. The age of the mice is indicated on the x-axis. *N* represents the number of animals analysed at each time point

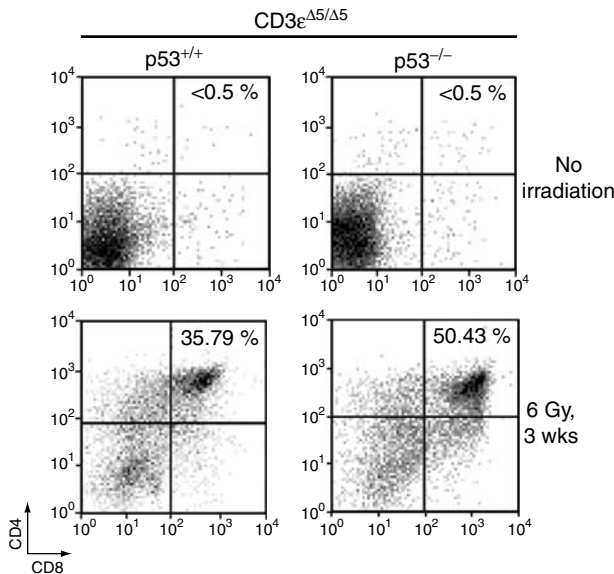


Figure 3 IR-induced DP thymocyte development in the absence of p53 expression. Thymocyte development was analysed by FACS, after labeling with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies in unirradiated (top) and irradiated (bottom) $p53^{+/+}$ (left) and $p53^{-/-}$ (right) $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice. Irradiated mice received 6 Gy of γ -irradiation within the first week of life, and were killed 3 weeks later. The unirradiated $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ animal was 4 weeks old. The percentage of DP thymocytes in irradiated animals is indicated in the top right quadrant

(Table 1 and Figure 3). The absolute number of DP thymocytes present in irradiated mice 2 and 3 weeks postirradiation is greater in the absence of p53 expression (Table 1). This difference may result from different immediate effects of γ -irradiation in $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ and $p53^{+/+}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice. The reduction in thymic cellularity 24 h postirradiation is only 1.4-fold in the former, compared to 5.2-fold in the latter. This difference probably reflects a blockade of p53-dependent apoptosis in $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ DN thymocytes (SC, unpublished

results). Hence, the number of DN thymocytes available for IR-induced differentiation is greater in irradiated p53-deficient mice. In the absence of p53 expression, IR-induced thymocyte differentiation seems to proceed faster. A low level of differentiation (0.76% DP thymocytes) is already detectable 1-week postirradiation. At 2 weeks post-treatment, the proportion of DP thymocytes is greater in p53-deficient than in p53-expressing, $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice ($28.77 \pm 21.19\%$ vs $10.61 \pm 8.25\%$, respectively, $P < 0.05$). However, this proportion does not increase significantly in irradiated $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice from 2 to 3 weeks postirradiation, as is the case in $p53^{+/+}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ animals. Therefore, a similar proportion of DP thymocytes is found 3 weeks after IR exposure in $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ and $p53^{+/+}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice (Table 1). At the molecular level, rearranged TCRA transcripts were found in cDNA prepared from irradiated $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ thymocytes (data not shown). These results show that p53 expression is not required to promote immature thymocyte survival/differentiation, following IR exposure. However, the kinetics of the response differs whether p53 is expressed or not.

p53 inactivation is not required for IR-induced thymocyte differentiation

We next investigated whether, on the other hand, p53 inactivation is required for IR-induced immature thymocyte differentiation, as proposed in irradiated $RAG-2^{-/-}$ mice (Jiang *et al.*, 1996). It is well established that radiation-induced apoptosis of DP thymocytes strictly depends on p53 activity *in vitro* (Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993; Strasser *et al.*, 1994; Hirao *et al.*, 2000) and *in vivo* (Candéias *et al.*, 1997), as also shown in Figure 4. A single whole-body 8 Gy γ -irradiation dose results within 36 h in a 50-fold reduction of thymic cellularity and the almost total disappearance of DP thymocytes in wt mice. In sharp contrast, in $p53^{-/-}$ mice, although irradiation induces a slight (less than two-fold) reduction in thymocyte number, the CD4/CD8 profile is not altered (Figure 4).

We therefore analysed IR-induced DP thymocyte apoptosis, in $p53^{+/+}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ and $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice that were irradiated twice, 3 weeks apart. The first irradiation (6 Gy) was designed to induce DP thymocyte differentiation, the second (8 Gy) to induce DP thymocyte apoptosis. As already shown, 6 Gy irradiation induces DP thymocyte differentiation in both types of mice (Figure 5a (top) and b). After the second irradiation (8 Gy), very few live thymocytes are recovered from twice-irradiated $p53^{+/+}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice, of which only 0.5% are DP. In contrast, the frequency (between 28 and 44%, $n = 3$) of DP thymocytes present in the thymus of twice-irradiated $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice is similar to that found in $p53^{-/-}CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice that received only one 6 Gy irradiation, and the total thymic cellularity is reduced only by a factor of 2 (Figure 5a (bottom) and b). These results show that IR-induced $p53^{+/+}$ DP thymocytes are sensitive to IR-induced apoptosis, whereas IR-induced $p53^{-/-}$ DP thymocytes are resistant. Similarly, the immature SP thymocytes

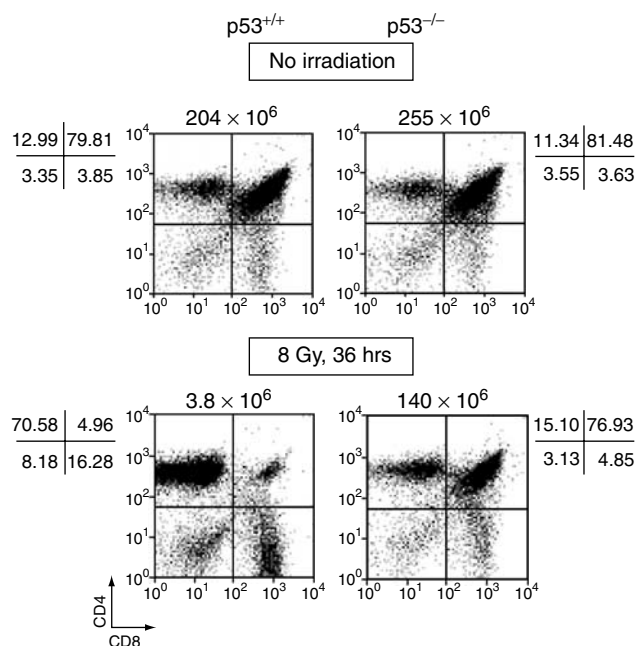


Figure 4 p53 expression is required for IR-induced DP thymocyte apoptosis. Thymocytes prepared from $p53^{+/+}$ and $p53^{-/-}$ BALB/c mice, either unirradiated (top) or 36 h following 8 Gy irradiation (bottom), were analysed for CD4 and CD8 expression to assess the extent of IR-induced apoptosis. Thymocyte number is indicated above each graph, and the percentage of thymocytes in each quadrant is indicated on the side

generated following IR exposure do disappear in $p53^{+/+}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ but not in $p53^{-/-}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice. Thus, in $p53$ -expressing mice, IR-induced thymocytes do retain p53 functionality. Consequently, thymocyte development in response to γ -irradiation does not require genetic or functional IR-induced p53 inactivation.

Only p53-deficient $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice are responsive to low-dose radiation

The kinetics of IR-induced DP differentiation differs whether p53 is expressed or not in $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice. To further investigate whether p53 expression affects other parameters of this response, we compared the response of $p53^{+/+}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ and $p53^{-/-}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice exposed to a lower dose of radiation. In separate experiments, we found that DP development in response to a 1.5 Gy dose

occurs only in $p53^{-/-}$ mice. To ascertain that this difference results only from a different p53 status, $p53^{+/+}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice were bred and their progeny irradiated within 7 days of birth, to compare directly IR-induced lymphocyte development in mice from the same litter. After 3 weeks, irradiated mice were killed.

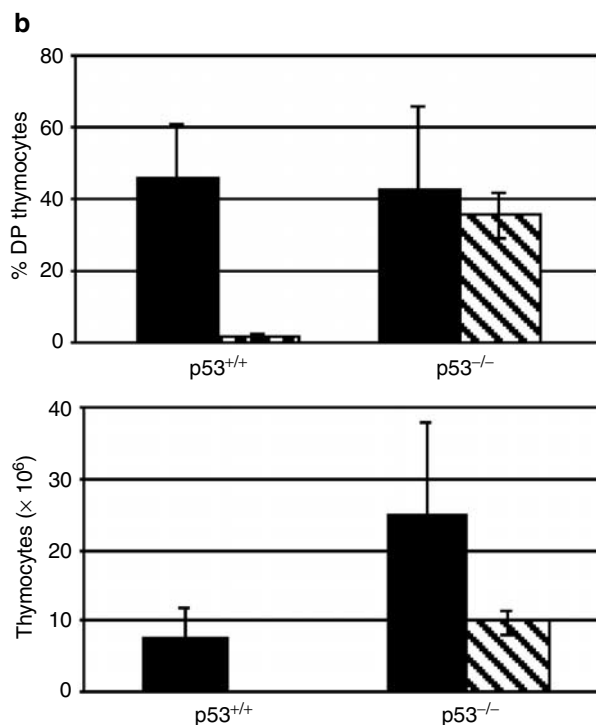
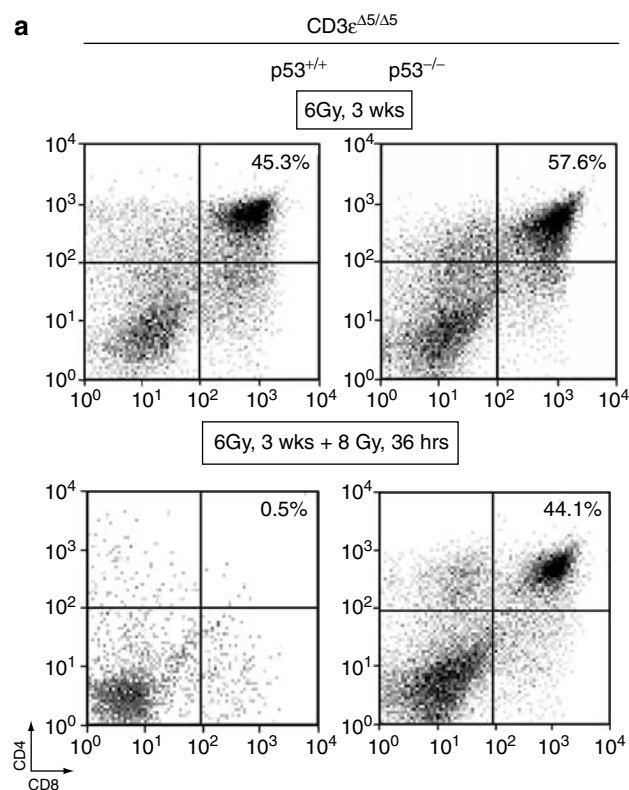


Figure 5 DP thymocytes generated in pre-TCR deficient mice in response to irradiation are sensitive to IR-induced apoptosis. (a) Thymocytes prepared from irradiated (6 Gy, 3 weeks) $p53^{+/+}$ (left) and $p53^{-/-}$ (right) $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice, either with no additional irradiation (top) or 36 h following 8 Gy irradiation (bottom), were analysed for CD4 and CD8 expression. The percentage of DP thymocytes is indicated in the top right quadrant. (b) Bar graph showing the mean \pm s.d. percentage of DP thymocytes (top) and total thymic cellularity (bottom) in once (black bars) and twice (hatched bars) irradiated $p53^{+/+}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ and $p53^{-/-}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice. The numbers for 6 Gy irradiated mice are from Table 1. The number of twice irradiated mice analysed are four and three for $p53^{+/+}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$ and $p53^{-/-}$ $CD3\epsilon^{A5/A5}$, respectively

T lymphocyte development was assessed at the cellular level by flow cytometry, and at the molecular level by RT-PCR analysis of rearranged TCRA gene transcription. The mice were then genotyped, to determine their p53 status. As shown in Figure 6, DP thymocyte development (Figure 6a) and TCRA gene transcription (Figure 6b) were found only in irradiated $p53^{-/-}$, but not $p53^{+/+}$, $CD3e^{A5/A5}$ littermates. Thus, $p53^{+/+}$ and $p53^{-/-}$ $CD3e^{A5/A5}$ mice differ not only in the kinetics of IR-induced immature thymocyte differentiation, but also in their sensitivity to a low-dose irradiation.

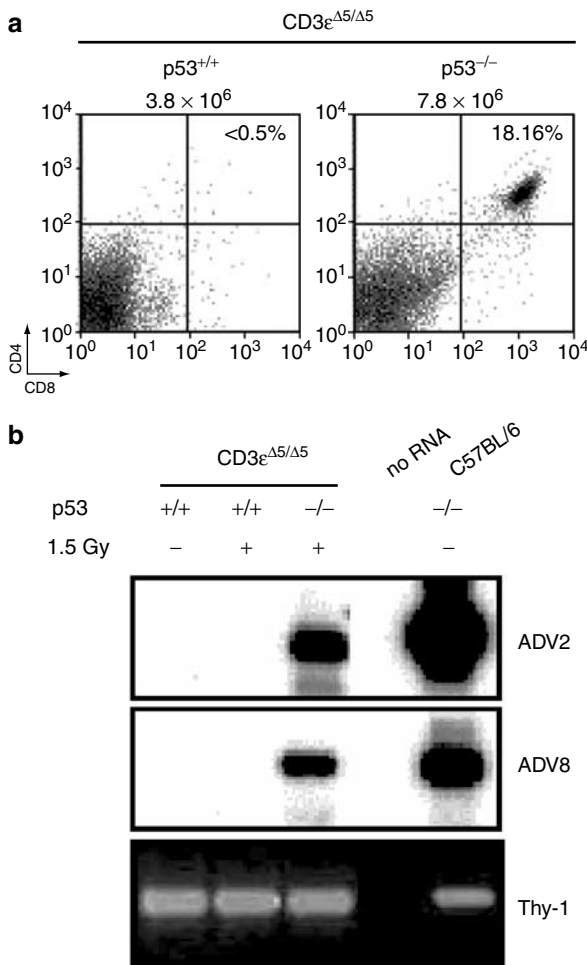


Figure 6 Low-dose irradiation promotes thymocyte differentiation and rearranged TCRA gene transcription only in the absence of p53 expression. **(a)** FACS analysis of thymocytes from $p53^{+/+}$ (left) and $p53^{-/-}$ (right) $CD3e^{A5/A5}$ littermates exposed to 1.5 Gy of γ -irradiation within a week from birth and killed 3 weeks later. DP thymocytes are present only in irradiated $p53$ -deficient animals. The number of thymocytes per thymus is indicated above the plots. These data are representative of three different experiments. **(b)** RT-PCR analysis of rearranged TCRA gene expression in thymocyte cDNA prepared from the mice shown in **(a)**, together with samples prepared from a nonirradiated $CD3e^{A5/A5}$ mouse and a wt $C57BL/6$ animal. The expression of ADV2 (top) and ADV8 (middle) containing rearranged TCRA genes are shown. The bottom panel shows an ethidium bromide staining of amplification of the Thy-1 gene, as cDNA input control. No RNA: cDNA negative control

Discussion

IR has been shown to promote the survival/differentiation of immature pre-TCR-deficient thymocytes in different strains of mice (Danska *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1994; Zuniga-Pflucker *et al.*, 1994; Guidos *et al.*, 1995; Bogue *et al.*, 1996; Nussenzweig *et al.*, 1997). The role of p53 in this phenomenon has been controversial (Bogue *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996). In this study, we investigated whether p53 activation or inactivation is required to induce immature thymocytes differentiation in response to γ -irradiation in $CD3e^{A5/A5}$ mice, which do not express the CD3 complex. Our results clearly demonstrate that a single 6 Gy dose of γ -irradiation promotes the survival and/or differentiation of pre-TCR-deficient $CD3e^{A5/A5}$ immature thymocytes whether p53 is expressed or not. Rearrangement of TCRA genes, present only at low levels in $CD3e^{A5/A5}$ mice, is sharply increased following irradiation, and transcription of these rearranged TCRA genes, which is not detected in unirradiated animals, is induced concomitantly, again irrespective of the p53 expression.

However, the mechanisms operating in the presence or absence of p53 appear to be different. The DP population appears earlier and reaches a maximum sooner in $p53^{-/-}$ than in $p53^{+/+}$ $CD3e^{A5/A5}$ mice exposed to a dose of 6 Gy. This faster kinetics is probably best explained by the absence of p53-dependent DN thymocyte apoptosis following irradiation (SC, unpublished results), which results in more DN cells being available for differentiation. More importantly, low-dose irradiation (1.5 Gy) induces DP thymocytes and rearranged TCRA gene transcription only in $p53$ -deficient, but not $p53$ wt mice. This last observation indicates that, when present, p53 plays a role in the control of IR-induced differentiation. The signaling threshold (or stimulation) needed for immature thymocytes to differentiate in response to IR is lower when p53 is not expressed. At that time, we can only speculate on the nature of p53 involvement. Activated p53 is known to activate or repress the transcription of numerous genes (Hall *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2002). A critical level of p53 activation may be required to promote the survival/differentiation of immature thymocytes, attained only in response to doses higher than 1.5 Gy. Alternatively, p53-dependent modulation of gene expression may impede the response elicited at that dose in $p53$ -deficient mice. In any case, and irrespective of the exact p53 role, this checkpoint is only transient, and the cells are not facing a choice between, on the one hand, p53 activation and apoptosis or, on the other, p53 inactivation and differentiation. Indeed, our data show that the vast majority of DP thymocytes generated after 6 Gy irradiation of $p53^{+/+}$ $CD3e^{A5/A5}$ mice are radiosensitive and enter apoptosis following a second irradiation. In contrast, $p53$ -negative IR-induced DP thymocytes are radioresistant. Thus, the radiosensitivity of DP thymocytes depends on the presence of a functional p53 molecule not only in wt mice but also in irradiated pre-TCR deficient mice.

Conflicting results have been obtained in RAG-deficient and *SCID* mice on p53 involvement in IR-induced thymocyte differentiation (Bogue *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996). Importantly, these mice differ in their ability to respond to DNA damage, because of the mutation affecting DNA-PKcs in *SCID* mice. Although this mutation may not totally inactivate DNA-PKcs (Danska *et al.*, 1996), *SCID* mice are nonetheless overtly sensitive to IR toxic effects (Jhappan *et al.*, 2000). In this DNA-repair-deficient model, p53 is required for IR-induced DP thymocyte differentiation (Bogue *et al.*, 1996). In contrast, our data show that p53 is dispensable in *CD3ε^{Δ5/Δ5}* mice, which possess functional DNA-repair machinery and DNA-PK activity. The simplest hypothesis to explain the differential requirement for p53 in irradiated *SCID* and *CD3ε*-deficient mice is that IR-induced thymocyte differentiation requires p53 activation only in DNA-PKcs mutated, but not DNA-PKcs wt mice, suggesting that DNA-PKcs and p53 regulate nonoverlapping, compensatory signaling pathways activated after irradiation. This model, depicted in Figure 7, proposes that both p53 and DNA-PK are able to promote DP thymocytes development in response to irradiation, and that at least one of them is sufficient to initiate the cascade of events leading to immature thymocytes survival and differentiation. However, these two signaling pathways are not concurrent. A 1.5 Gy dose elicits a response only in p53-deficient mice. The DNA-PK-dependent pathway is therefore operative only in the absence of p53 expression.

Taken together, our results show that IR rescues immature thymocyte survival and differentiation, including rearranged TCRA gene transcription, in the

presence and absence of p53. When p53 is expressed, its inactivation is not a prerequisite to thymocyte differentiation. IR-induced differentiation in *p53^{+/+}* mice proceeds with a slower kinetics and requires a higher IR dose than in p53-deficient mice, indicating that, when present, p53 is involved in this response. Therefore, IR-induced immature thymocyte differentiation can be induced either by a p53-dependent/DNA-PK-independent or a p53-independent/DNA-PK-dependent pathway.

Materials and methods

Mice

CD3ε^{Δ5/Δ5} and *RAG-2^{-/-}* mice, both on *C57BL/6* background, and p53-deficient mice, on a mixed *C57BL/6/129 Sv* and on a *BALB/c* background, were bred in our animal facility at the Commissariat à l'Energie Atomique-Grenoble. *C57BL/6/129 Sv* p53-deficient mice were mated with *CD3ε^{Δ5/Δ5}* to generate *p53^{-/-}CD3ε^{Δ5/Δ5}* animals. Irradiations were performed in a Cs¹³⁷ irradiator (IBL6000, Cis-Bio, France) at a dose rate of 1.9 Gy/min.

FACS analysis

Single-cell suspensions were prepared from the thymus of indicated animals and labeled with phycoerythrin-coupled anti-CD4 and FITC-coupled anti-CD8 antibodies as described (Mancini *et al.*, 1999). Stained cells were analysed on a FacsCalibur flow cytometer, with Cell Quest software (Becton Dickinson). Data were analysed either with Cell Quest or the WinMDI 2.8 software (J Trotter, Scripps Research Institute).

RNA preparation–cDNA synthesis–PCR

RT–PCR analysis of rearranged TCRA gene transcription was performed as previously described (Mancini *et al.*, 2001). Thymocyte cDNA prepared from control and irradiated mice were amplified with primers specific for rearranged ADV2 and ADV8 gene families. cDNA input was checked by amplifying Thy-1 transcripts. PCR products were separated on an agarose gel and revealed after transfer onto Hybond N membrane (Amersham) and hybridization with radiolabeled oligonucleotide probes as described.

DNA extraction–PCR analysis of ADV/AJ rearrangement

Genomic DNA was prepared from unirradiated and irradiated (6 Gy, 3 weeks) *CD3ε^{Δ5/Δ5}*, *Rag-2^{-/-}* and *C57BL/6* total thymocytes using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. ADV2/AJ rearrangements were amplified in four PCR reactions with primers hybridising downstream of AJ56, AJ48, AJ27 or AJ23 and an ADV2 gene family-specific primer, and PCR products were revealed by Southern blotting as described (Mancini *et al.*, 2001). DNA input was controlled by the amplification of a nonrearranging segment of the TCRα chain constant region (AC).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by a nonparametric Mann–Whitney test using the SPSS 9.01 software (SPSS Inc.).

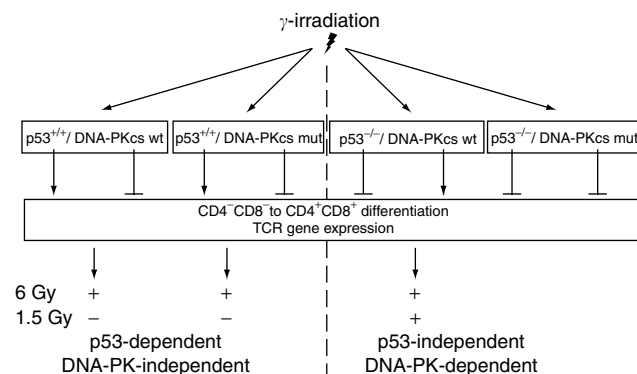


Figure 7 A model for IR-induced immature thymocyte differentiation. γ -irradiation induces immature thymocyte differentiation and rearranged TCR gene expression both in the presence or absence of p53 expression (p53-dependent and p53-independent pathways, separated by the dashed vertical line). No IR-induced differentiation is observed in p53-deficient *SCID* mice (Bogue *et al.*, 1996). Thus, p53 and DNA-PKcs seem to be the only molecules required to promote thymocyte survival/differentiation following IR exposure. In DNA-PKcs mutated *SCID* mice, p53 activation is required for IR-induced thymocyte differentiation. In DNA-PK wt *CD3ε^{Δ5/Δ5}* mice, p53 activation is dispensable. Only *p53^{-/-}* but not *p53^{+/+}* DNA-PK wt mice respond to a 1.5 Gy dose, indicating that the DNA-PK pathway is not operational in these mice. Therefore, either p53 or DNA-PKcs activity is required for IR to elicit differentiation. DNA-PKcs wt represents *CD3ε^{Δ5/Δ5}* mice; DNA-PKcs mut represents *SCID* mice

Abbreviations

SCID, severe combined immune deficiency; RAG, recombination-activating gene; IR, ionizing radiation; TCR, T-cell receptor; DN, double negative; DP, double positive; SP, single positive; Gy, gray; wt, wild type; DNA-PKcs, catalytic subunit of the protein kinase activated by DNA.

Acknowledgements

We thank Véronique Collin for assistance with FACS analysis, Irène Maréchal and Nicolas Chaumontel for animal care and

Drs R Ceredig, HR McDonald and C Viret for the critical reading of the manuscript. This work was supported by institutional grants from the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale', the 'Commissariat à l'Energie Atomique' and the Joseph Fourier University, and by a specific action ('Thématiques Prioritaires') from the 'Région Rhône-Alpes. SJCM was supported by grants from the 'Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie' and from 'La Ligue Nationale pour la Recherche contre le Cancer'.

References

- Araki R, Fujimori A, Hamatani K, Mita K, Saito T, Mori M, Fukumura R, Morimyo M, Muto M, Itoh M, Tatsumi K and Abe M. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2438–2443.
- Bogue MA, Zhu C, Aguilar-Cordova E, Donehower LA and Roth DB. (1996). *Genes Dev.*, **10**, 553–565.
- Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M and May E. (2000). *Oncogene*, **19**, 649–660.
- Candéias SM, Durum SK and Muegge K. (1997). *Biochimie*, **79**, 607–612.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML and Wyllie AH. (1993). *Nature*, **362**, 849–852.
- Danska JS, Holland DP, Mariathasan S, Williams KM and Guidos CJ. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5507–5517.
- Danska JS, Pflumio F, Williams CJ, Huner O, Dick JE and Guidos CJ. (1994). *Science*, **266**, 450–455.
- DeJarnette JB, Sommers CL, Huang K, Woodside KJ, Emmons R, Katz K, Shores EW and Love PE. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14909–14914.
- Gallagher M, Candéias S, Martinon C, Borel E, Malissen M, Marche PN and Jouvin-Marche E. (1998). *Eur. J. Immunol.*, **28**, 3878–3885.
- Guidos CJ, Williams CJ, Grandal I, Knowles G, Huang MT and Danska JS. (1996). *Genes Dev.*, **10**, 2038–2054.
- Guidos CJ, Williams CJ, Wu GE, Paige CJ and Danska JS. (1995). *J. Exp. Med.*, **181**, 1187–1195.
- Haks MC, Krimpenfort P, van den Brakel JH and Kruisbeek AM. (1999). *Immunity*, **11**, 91–101.
- Hall SR, Campbell LE and Meek DW. (1996). *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1119–1126.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ and Mak TW. (2000). *Science*, **287**, 1824–1827.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J and Murphy M. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 3247–3257.
- Hugo P, Waanders GA, Scollay R, Petrie HT and Boyd RL. (1991). *Eur. J. Immunol.*, **21**, 835–838.
- Jhappan C, Yusufzai TM, Anderson S, Anver MR and Merlino G. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4075–4083.
- Jiang D, Lenardo MJ and Zuniga-Pflucker C. (1996). *J. Exp. Med.*, **183**, 1923–1928.
- Lakin ND and Jackson SP. (1999). *Oncogene*, **18**, 7644–7655.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA and Jacks T. (1993). *Nature*, **362**, 847–849.
- Malissen M, Gillet A, Ardouin L, Bouvier G, Trucy J, Ferrier P, Vivier E and Malissen B. (1995). *EMBO J.*, **14**, 4641–4653.
- Mancini S, Candéias SM, Fehling HJ, von Boehmer H, Jouvin-Marche E and Marche PN. (1999). *J. Immunol.*, **163**, 6053–6059.
- Mancini SJ, Candéias SM, Di Santo JP, Ferrier P, Marche PN and Jouvin-Marche E. (2001). *J. Immunol.*, **167**, 4485–4493.
- Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S and Papaioannou VE. (1992). *Cell*, **68**, 869–877.
- Murphy WJ, Durum SK, Anver MR, Ferris DK, McVicar DW, O'Shea JJ, Ruscetti SK, Smith MR, Young HA and Longo DL. (1994). *J. Immunol.*, **153**, 1004–1014.
- Nacht M and Jacks T. (1998). *Cell. Growth Differ.*, **9**, 131–138.
- Nacht M, Strasser A, Chan YR, Harris AW, Schissel M, Bronson RT and Jacks T. (1996). *Genes Dev.*, **10**, 2055–2066.
- Nelson WG and Kastan MB. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1815–1823.
- Newton K, Harris AW and Strasser A. (2000). *EMBO J.*, **19**, 931–941.
- Nussenzweig A, Sokol K, Burgman P, Li L and Li GC. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13588–13593.
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F and Stall AM. (1992). *Cell*, **68**, 855–867.
- Sionov RV and Haupt Y. (1999). *Oncogene*, **18**, 6145–6157.
- Strasser A, Harris AW, Jacks T and Cory S. (1994). *Cell*, **79**, 329–339.
- von Boehmer H, Aifantis I, Feinberg J, Lechner O, Saint-Ruf C, Walter U, Buer J and Azogui O. (1999). *Curr. Opin. Immunol.*, **11**, 135–142.
- Wang B, Wang N, Salio M, Sharpe A, Allen D, She J and Terhorst C. (1998). *J. Exp. Med.*, **188**, 1375–1380.
- Wang B, Wang N, Whitehurst CE, She J, Chen J and Terhorst C. (1999). *J. Immunol.*, **162**, 88–94.
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH and Levine AJ. (2000). *Genes Dev.*, **14**, 981–993.
- Zuniga-Pflucker JC, Jiang D, Schwartzberg PL and Lenardo MJ. (1994). *J. Exp. Med.*, **180**, 1517–1521.

ARTICLE II

et données supplémentaires / conclusions

Radiation induced immature thymocyte differentiation unravels multiple pre-TCR-derived signal pathways.

Candéias SM, Touvrey C, Mancini SJ, Azizi Samir LA, Borel E, Colin V,
Malissen M, Jouvin-Marche E, Marche PN

ARTICLE II

et données complémentaires / conclusions

Radiation induced immature thymocyte differentiation unravels multiple pre-TCR-derived signal pathways.

Candéias SM, Touvrey C, Mancini SJ, Azizi Samir LA, Borel E, Colin V, Malissen M, Jouvin-Marche E, Marche PN

Nous avons poursuivi ces travaux afin d'analyser plus en détail le rôle de la signalisation proximale du pré-TCR dans la réponse à l'irradiation. La signalisation issue des CIC et du pré-TCR est initiée par la phosphorylation des motifs ITAM par Lck et Fyn, des PTK de la famille Src. Cette phosphorylation provoque le recrutement de Syk et de ZAP70. Tandis que Syk s'autophosphoryle pour être active, l'activation de ZAP70 par des PTK lui permet d'activer à son tour LAT par phosphorylation. LAT est un intégrateur moléculaire qui se trouve à l'embranchement des différentes voies de signalisation qui mènent à l'activation de la transcription en réponse à l'activation des CIC et du pré-TCR (Norian and Koretzky, 2000). Afin de déterminer la nécessité de l'activation des CIC et de la voie de signalisation pré-TCR, nous avons comparé l'effet des radiations ionisantes sur la différenciation des thymocytes dans les souris RAG-2^{-/-}, CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ et LAT^{-/-} ou LAT-3Y.

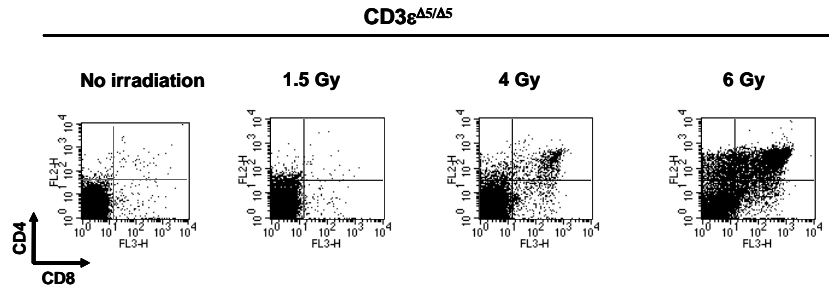
La comparaison de la réponse à l'irradiation des souris RAG-2^{-/-} et des souris CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ montre que la proportion des LT DP obtenue 3 semaines après une irradiation de 6 Gy (34%) de souris CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ est nettement inférieure à celle obtenue dans les mêmes conditions chez les souris RAG-2^{-/-} (75%). Ce résultat suggère qu'en absence de signalisation par les CIC la différenciation est moins efficace. Dans les souris LAT^{-/-}, il existe de fortes variations inter-individu et la réponse semble stochastique. Par contre dans les LAT-3Y, il n'y a quasiment pas de réponse radio-induite. Ce résultat confirme que la cascade de signalisation du pré-TCR est nécessaire pour induire la différenciation des thymocytes en réponse à un stress génotoxique. Il est possible que l'irradiation induise une réorganisation des rafts lipidiques et amène à proximité les éléments nécessaires à l'initialisation de la signalisation en aval du pré-TCR, rôle normalement dévolu au pré-TCR. Dans ce contexte, LAT-3Y agirait comme un dominant négatif en complexant les molécules nécessaires à la signalisation sans pouvoir déclencher la signalisation.

Chez les thymocytes de souris sauvages, l'induction du passage au stade DP suite à la sélection est concomitante avec l'expression de CD2 (Rodewald et al., 1993; Yagita et al., 1989). Ces deux événements dépendent normalement des signaux pré-TCR. Dans les souris RAG-2^{-/-} et CD3ε^{Δ5/Δ5}, l'expression de CD2 a lieu très tôt (dès une semaine) alors qu'aucune cellule DP ne s'est encore développée. Il y a donc une dissociation des voies de signalisation pré-TCR like qui sont ensuite intégrées par LAT puisque dans les LAT^{-/-} et LAT-3Y aucune augmentation de l'expression de CD2 n'est détectable.

Nous avons cherché l'origine du réarrangement TCRA induit suite à l'irradiation. L'analyse par PCR des réarrangements montre que leur étendue varie avec la dose d'irradiation à laquelle ont été soumises les souris CD3ε^{Δ5/Δ5}. L'importance de l'induction des réarrangements semble être liée à la quantité de DP radio-induits (Figure 11). L'analyse des réarrangements dans des populations de thymocytes triées par cytométrie de flux montre de plus que le réarrangement prend majoritairement place au stade DP comme dans une souris sauvage (Figure 12). L'irradiation provoque cependant une augmentation de la quantité de cellules en cycle. L'augmentation du niveau de réarrangement TCRA pourrait donc provenir de la prolifération de quelques clones radio-résistants ayant préalablement réarrangé leurs gènes TCRA. Nous avons donc étudié le profil de réarrangement des gènes TCRB qui sont réarrangés normalement dans une souris CD3ε^{Δ5/Δ5}. Les profils de réarrangement des gènes TCRB sont réguliers et comparables à ceux obtenus dans une souris sauvage. Une prolifération préférentielle de clones suite à l'irradiation aurait dû les altérer. Afin de confirmer la démonstration, nous avons quantifié les TRECs. En effet chaque événement de réarrangement par excision génère un cercle d'excision qui ne se réplique pas au cours de la division cellulaire. Chaque TRECS marque donc un nouvel événement de réarrangement. L'irradiation des souris CD3ε^{Δ5/Δ5} est accompagnée de l'apparition des TRECs formés lors du réarrangement des gènes TCRA. Ces TRECs ne sont pas détectables dans les souris non irradiées (Figure 13A) Les réarrangements détectés après irradiation sont donc bien dûs à du réarrangement de novo.

Afin de quantifier ces réarrangements nous avons utilisé un événement de réarrangement spécifique des thymocytes αβ effectuant la transition DN/DP. Ce réarrangement entre δRec-1 et AJ61 se fait à une fréquence bien supérieure à celle du réarrangement TCRA le plus répandu et est par conséquent plus révélateur de l'activité de recombinaison des thymocytes entrant au stade DP tout en étant plus facile à détecter.

A/



B/

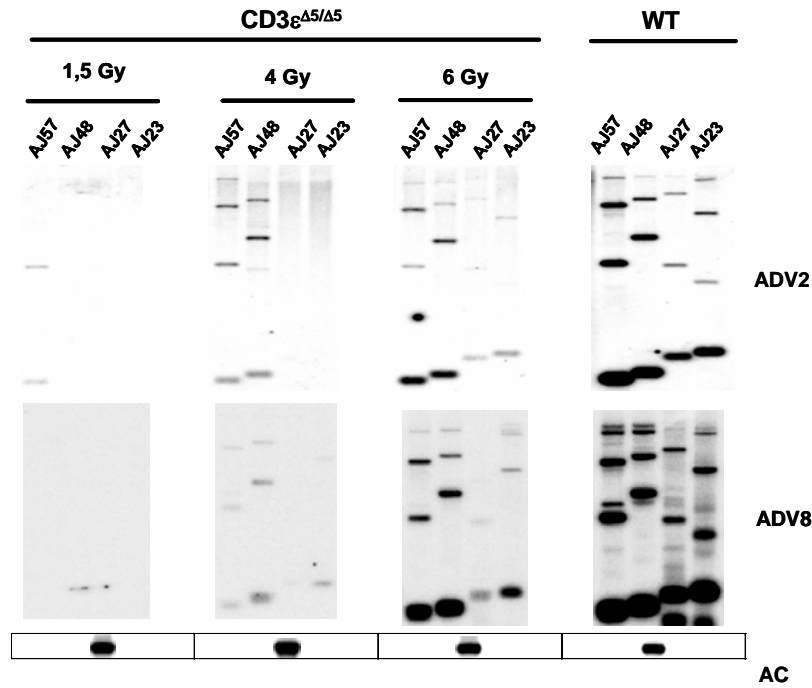


Figure 11: Différenciation radio-induite des thymocytes de souris CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ et augmentation des réarrangements des gènes TCRA. A/ Marquage CD4/CD8 par FACS. L'irradiation induit la différenciation de manière dose dépendante. B/ Analyse des réarrangements ADV2/AJ et ADV8/AJ par PCR multiplexe. Le contrôle de charge est effectué par l'amplification du gène AC qui ne se réarrange pas.

La quantification par PCR quantitative en temps réel révèle que chez les souris CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ irradiées, le niveau de recombinaison représente seulement 1/5 à 1/10 de celui retrouvé dans les thymocytes de souris sauvages. Un événement de signalisation supplémentaire, non induit par l'irradiation, est donc nécessaire au réarrangement des gènes TCRA.

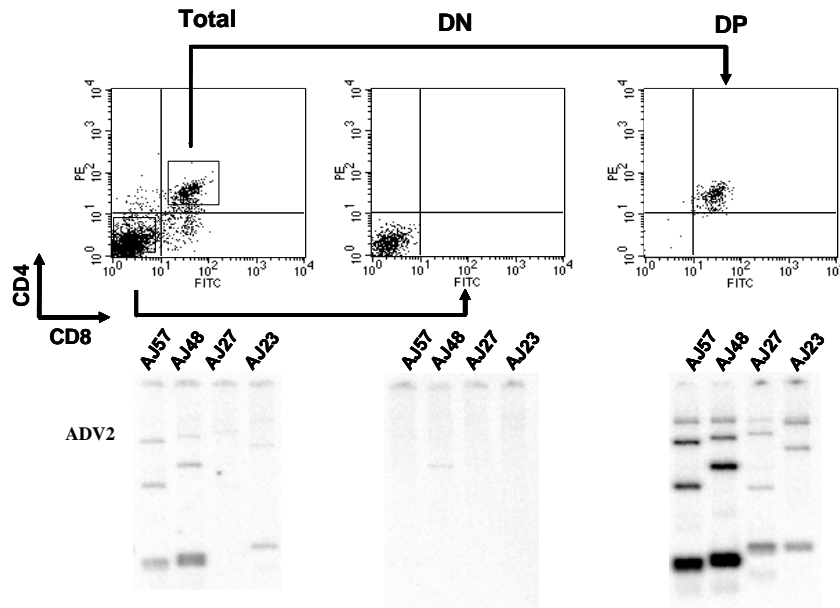


Figure 12: Le réarrangement TCRA radio-induit prend place au stade DP. Les populations DN et DP ont été triées par FACS. Les réarrangements ADV2/AJ ont ensuite été amplifiés par PCR.

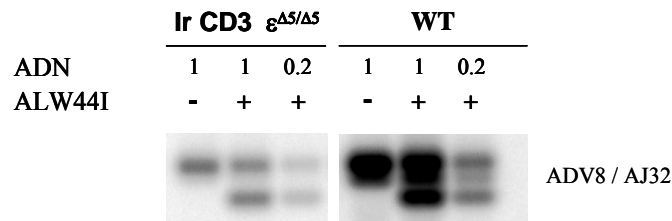
Pour finir, nous avons étudié les effets de l'irradiation à long terme. En effet il avait été préalablement montré que le transfert adoptif de moëlle osseuse de souris SCID irradiées dans des souris SCID non irradiés suffisait à induire la reprise de la différenciation des thymocytes ainsi que le réarrangement des gènes TCR(Wang et al., 1999a). Ce résultat suggérait un effet à long terme de l'irradiation sur les précurseurs lymphocytaires. A plus de 14 semaines après une irradiation de 6 Gy, 4 sur 7 souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ présentaient une proportion de thymocytes DP allant de 36% à 95% et dans 3 cas sur 4 la taille du thymus était fortement augmentée. L'analyse des réarrangements TCRB a révélé dans ces souris un profil complètement perturbé avec des réarrangements prédominants. Ce résultat suggère donc une expansion polyclonale d'un petit nombre de thymocytes. L'irradiation induit donc de façon transitoire la différenciation des thymocytes dans la moitié des souris et provoque dans l'autre moitié une transformation tumorale. La protéine p53 reste cependant active puisque les thymocytes d'une souris irradié depuis 16 semaines et possédant une lymphoprolifération restent sensibles à l'apoptose radio-induite.

Cette étude montre donc que la réponse à l'irradiation emprunte la voie de signalisation pré-TCR. Chez les souris RAG la différenciation radio induite est plus efficace suggérant l'existence d'une voie CD3 dépendante et d'une voie CD3 indépendante. Il se

pourrait aussi que la différence de densité en complexe CIC due à l'abrogation de l'expression de CD3 ϵ , δ et γ suffise à expliquer cette différence. En réponse à l'irradiation, les signaux pré-TCR like induisant la différenciation et l'expression de CD2 sont dissociés. Ces deux voies sont cependant toutes deux dépendantes de LAT qui joue le rôle d'intégrateur de signaux dans le LT. Cette signalisation suffit à promouvoir la différenciation des thymocytes jusqu'au stade DP dans les souris CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$. L'augmentation du réarrangement des gènes TCRA provient de réarrangements *de novo*. Comme dans les souris sauvages c'est probablement le passage du stade DN au stade DP qui provoque le réarrangement des gènes TCRA. L'action de l'irradiation sur le réarrangement est donc indirecte. Le niveau de réarrangement est cependant inférieur à celui d'une souris sauvage suggérant qu'il manque un « second signal », durant la transition DN/DP, pour induire un niveau de réarrangement similaire à celui des souris sauvages.

Afin de vérifier que les réarrangements sont bien réalisés par la machinerie « traditionnelle » de recombinaison V(D)J et non par une activité de réparation activée en réponse à l'irradiation comme dans les SCID, nous avons analysé la structure des JS TCRA dans les souris CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ irradiées. La jonction signal est formée par la fusion parfaite des RSS des gènes qui se sont réarrangés. Lors de cette fusion, si les RSS comportent un heptamère canonique, il y a création d'un site de restriction reconnu par l'enzyme ApaL1. La digestion du produit d'amplification par PCR de ces JS permet donc de mettre en évidence de manière simple la fidélité de la résolution des extrémités codantes. Nous avons donc tiré partie de cette propriété afin de comparer la fidélité de la formation des JS dans des souris sauvages et des souris CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ irradiées. Dans les deux cas, la digestion des JS formées lors du réarrangement des gènes TCRA est incomplète (Figure 13A). Les JS formées lors du réarrangement des gènes codant pour la chaîne TCRA sont donc modifiées aussi bien dans les souris sauvages que dans les souris irradiées. La mesure de l'intensité du marquage radioactif des produits digérés et non digérés grâce au logiciel imagequant permet de déterminer approximativement la proportion de JS infidèles. La comparaison a été effectuée sur 5 JS différentes dans 2 souris sauvages et deux souris CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ irradiées (Figure 13B). De façon surprenante toutes ces JS ont un taux de modifications supérieur à 40%. La variabilité inter-individu est plus élevée dans les souris CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ irradiée suggérant que la réponse à l'irradiation est différente selon les individus. Ce résultat n'est toutefois pas surprenant puisque la proportion de DP radio-induit varie aussi considérablement d'un individu à l'autre.

A/



B/

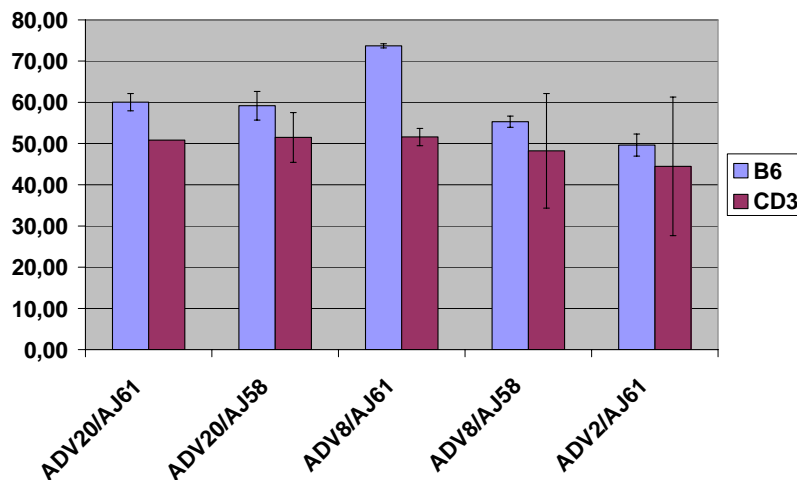


Figure 13: Analyse des modifications des JS formées durant le réarrangement des gènes TCRA.

A/ Digestion des produits d'amplification des jonctions ADV8/AJ32 par ALW44I un isoschisme de ApaL1.

Une dilution de la quantité de produit de PCR mis à digérer a été effectuée afin de vérifier que la résistance à la digestion n'était pas due à une quantité limitante d'enzyme. La présence de l'enzyme est marquée par un +.

B/ Quantification en % de la proportion de produits de PCR ADV/AJ résistants à la digestion par ApaL1 dans les souris sauvages (B6) et dans les souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ irradiées.

De manière importante la fidélité du mécanisme impliqué dans la formation des JS est similaire entre les souris sauvage et les souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ irradiées. Ce résultat renforce la probabilité que le réarrangement TCRA induit suite à l'irradiation soit bien du à l'activité de la recombinaison.

« Radiation induced immature thymocyte differentiation unravels multiple pre-TCR-derived signal pathways »

Serge Michel Candéas^{*,§}, Cédric Touvrey^{*}, Amina Azizi Samir^{*}, Stéphane Jean Charles Mancini^{*,‡}, Eve Borel^{*}, Véronique Colin^{*}, Marie Malissen[†], Evelyne Jouvin-Marche^{*} and Patrice Noël Marche^{*}.

^{*} Laboratoire d'Immunochimie, Commissariat à l'Energie Atomique-Grenoble, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, INSERM U548, Université Joseph Fourier, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble, France ; [†] Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Parc Scientifique de Luminy, Case 906, 13288 Marseille, France.

[‡] present address: Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Parc Scientifique de Luminy, Case 906, 13288 Marseille, France.

[§]: Corresponding author:

email: immuno@dsvsud.cea.fr

FAX: (33)(0)4-38-78-98-03

Running title: Immature thymocyte differentiation in irradiated mice.

Key words: T lymphocyte differentiation; pre-TCR signaling; irradiation; CD3; V(D)J recombination;

Abstract

Expression of a functional pre-TCR onto the cell surface provides essential differentiation/survival signal to developing T lymphocytes in the thymus and constitutes the first major checkpoint that they encounter during their maturation. Therefore, T lymphocyte development is arrested at an early immature stage in mice unable to assemble –or to signal from– a pre-TCR. This developmental block can be partially relieved after exposure of pre-TCR-deficient animals to a single dose of whole body ionizing radiation, even if pre-TCR expression *per se* is not rescued. To understand the nature of the differentiation/survival signaling events activated after radiation exposure in developing thymocytes, we analyzed and compared the response to radiation of mice mutated for pre-TCR assembly and/or signaling. Our results show that radiation induces differentiation of quiescent CD2⁻CD4⁻CD8⁻ thymocytes into cycling CD2⁺CD4⁺CD8⁺ cells by CD3-dependent and CD3-independent pathways. These pathways differ in their ability to induce several events usually coordinated during pre-TCR signaling. They are transduced into the cell through the adaptor molecule LAT, as radiation exposure effects are very low in absence of a functional LAT molecule. Altogether, our findings suggest that the pre-TCR plays an essential role in the integration and coordination of several partially overlapping signaling pathways.

Introduction

Intrathymic T cell precursor development is controlled in part by sequential rearrangement and expression of TCR genes and can be followed by the regulated expression of various cell surface molecules, including CD44, CD25, CD4, CD8 and CD2. Immature double negative (DN) thymocytes express neither CD4 nor CD8 and give rise to CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) cells, which in turn generate either CD4⁺8⁻ and CD4⁻8⁺ mature, single positive thymocytes, the precursors of peripheral αβ T lymphocytes. Within the DN compartment, expression of CD44 and CD25 delineate four sequential stages of maturation with the following phenotypes: CD44⁺25⁻, 44⁺25⁺, 44⁻25⁺ and 44⁻25⁻ (DN1 to DN4 stages), respectively (1, 2). CD2 expression is also regulated during thymocyte development. It is expressed in the DN1 population, on natural killer (NK) cells, but not on CD25⁺ DN2 and DN3 thymocytes (3). CD2 expression is then found on all T lymphocytes from the DN4 stage. TCRB gene recombination is initiated during the DN2 to DN3 transition. Cells with productively rearranged TCRB genes then express a pre-TCR composed of the TCRβ chain associated with the invariant pTα chain and the CD3/TCRζ complex. Pre-TCR signaling induces a burst of proliferation and differentiation of DN3 thymocytes to the DP compartment, via the DN4 stage (4). TCRA gene rearrangement is massively induced during the DN to DP transition, concomitantly to CD2 expression (5). Association of the pTα and TCRβ chains with the CD3 complex is necessary both for expression of and signaling from the pre-TCR. Pre-TCR assembly on DN3 thymocytes provides survival/differentiation signals and constitutes the first major checkpoint in αβ T lymphocyte maturation.

Proximal pre-TCR signaling requires the activity of several protein tyrosine kinases (PTKs) and culminates in the phosphorylation of the lipid raft-associated adaptator molecule LAT (6). This cascade is initiated when the SRC-family PTKs p56^{lck} and p59^{lyn} phosphorylate the intracellular domains of the CD3 and TCRζ chains on conserved tyrosine residues in their ITAM motives (7). The syk family PTKs ZAP-70 and syk are then recruited onto these phosphorylated ITAMs and, in turn, phosphorylate LAT on several tyrosine residues. The association of activated LAT with several SH2 domain containing intra-cellular proteins triggers multiple signaling events, including, among others, activation of phospholipase Cγ1 and extra cellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathways, up-regulation of early growth factor (Egr) 1, 2 and 3 genes transcription, proliferation and differentiation to the DP stage (8)

The combined inactivation of p59^{lyn} and p56^{lck} (9, 10), or of ZAP-70 and syk (11), the PTKs responsible for LAT activation, or the inactivation of LAT itself leads to a complete block of differentiation at the DN3 stage. A block at the same stage is observed in mice unable to perform V(D)J recombination (12, 13) or to express a pre-TCR on cell surface because of CD3 complex disruption (14-17). In absence of pre-TCR-derived differentiation/survival signals, DN3 thymocytes

are eliminated by p53- and/or FADD-dependent apoptosis (18). The complexity of the signaling pathways activated during -and presumably required for- immature thymocyte differentiation from the DN3 stage to the DP compartment via DN4 intermediates was recently illustrated by a comprehensive study showing that the expression of numerous DNA binding proteins/transcription factors is modulated during this progression (19). It is clear however that these signaling pathways originate from LAT activation. The lack of the LAT protein expression completely abrogates $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocyte development (20, 21) and expression of a signaling-compromised LAT molecule (LAT-3Y) selectively impairs $\alpha\beta$ thymocyte development beyond the DN3 stage (21).

Exposure of immunodeficient SCID mice, which possess impaired DNA repair mechanisms, to a single dose of ionizing radiation (IR) alleviates the blockade of thymocyte differentiation at the DN3 stage and induces in a few days development of DP thymocytes (22-24). This effect is probably due to IR-induced rescue of TCRB gene rearrangement, which restores pre-TCR expression on immature thymocytes (22, 24-26). IR-induced immature thymocyte differentiation is also effective in V(D)J recombination deficient RAG knock out mice (27-29), in the total absence of TCRB gene rearrangement and pre-TCR expression. However, in these mice, the kinetics of DP thymocyte development is slower. In RAG-1^{-/-} mice, immature thymocyte differentiation induced either by *in vivo* CD3 cross-linking or by γ irradiation exposure is reduced to similar a extend following p56^{lck} inactivation (30). Thus, IR-induced DP thymocyte development results at least in part from signals initiated from membrane associated PTKs participating in pre-TCR signaling via CD3 ITAM phosphorylation. In CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ mice, insertion of the Neo gene in the CD3 ϵ gene not only inactivates CD3 ϵ expression, but also represses the transcription and expression of the neighboring CD3 γ and δ genes. Consequently, the CD3 complex is not expressed onto the cell surface, either as clonotype independent CD3 complexes or pre-TCR and thymocyte maturation is arrested, like in RAG-2^{-/-} mice, at the DN3 stage (14). Surprisingly, IR-exposure is still able to induced DP thymocyte differentiation in CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ mice (31), and we showed that the extent, kinetics and IR-dose sensitivity in these animals are modulated by the expression of the tumor suppressor protein p53, which plays a central role in the orchestration of the cellular response to genotoxic stress.

In this paper, we compared the differentiation of CD2⁻DN3 thymocytes into CD2⁺DP thymocytes following IR-exposure in CD3-expressing RAG-2^{-/-} mice, CD3 ϵ -deficient CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ mice, LAT^{-/-} mice and mice expressing a non functional, membrane bound LAT3Y molecule. When compared to RAG-2^{-/-} mice, CD3-deficiency specifically reduces the extent of some, but not all, aspects of IR-induced differentiation, whereas LAT inactivation essentially abrogates IR induced thymocyte differentiation. Thus, in absence of pre-TCR expression at the cell surface, IR exposure induces the propagation into the cell, through LAT, of pre-TCR-like signals from different membrane-associated components of the pre-TCR signaling cascade.

Materials and Methods

Mice

CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ (14) and RAG-2 $^{-/-}$ (13) mice, both on C57BL/6 background, were bred in our animal facility at the Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France. LAT mutated mice (21) were generated and maintained at the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France. Irradiations were performed in an IBL6000 Cs¹³⁷ irradiator (Cis-Bio), with a dose rate of 1.15 Gy/min or in the ⁶⁰Co Anemone-Bio irradiator at the ARC/Nucleart facility, (Grenoble), at a dose rate of 2 Gy/min.

FACS analysis

Single cell suspensions were prepared as described (32). They were then incubated in the same medium with monoclonal antibodies at the optimum concentrations for 15 min at room temperature under agitation. Monoclonal antibodies used in this study are: anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD2 (RM2-5), anti-CD44 (IM7) anti-CD25 (7D4) and anti-NK1.1 (PK136), either directly conjugated or biotinylated. Biotinylated antibodies were revealed with FITC-or Cy-Chrome conjugated streptavidin. Before staining, cells were incubated in FcBlock to reduce non-specific fixation of monoclonal antibodies. For cell cycle analysis, determination of DNA content was performed as previously described (33, 34) after staining of the cells with PE- conjugated anti-CD4 and biotinylated anti-CD8 antibodies. Anti-CD8 staining was revealed by streptavidin-Alexa. All monoclonal antibodies, second step reagents and FcBlock were purchased from BD Pharmingen, except streptavidin Alexa (Molecular Probes). Stained cells were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer, with either the Cell Quest (Becton Dickinson) or Win MDi (J. Trotter, The Scripps Clinic Research Institute) softwares.

DNA preparation

Thymocyte DNA was prepared from the indicated mice using the Nucleospin tissue Kit (Macherey–Nagel), according to the manufacturer's instructions.

PCR analysis of TCR gene rearrangement

For signal joint analysis thymocyte DNA (100 ng) was amplified with relevant primers (10 pmoles) using AmpliTaq Gold PCR Mix (Applied Biosystems) as follows: 94°C, 10 m, then 35 cycles consisting of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C, followed by a 10 m incubation at 72°C. PCR reactions were carried out on a GenAmp PCR system 9600 apparatus (Perkin-Elmer) in a final volume of 25 μ L. The PCR products were then resolved on an agarose gel, transferred onto an N-Hybrid+ membrane (Amersham Biosciences) and hybridized with a radio-labeled probe.

For quantification of δ Rec-1/AJ61 signal joints, 25 ng of genomic DNA was amplified with relevant primers in FastStart SyBrGreen mix in a LightCycler (Roche Diagnostic) using the following

parameters: 95°C for 10 min, then 15 sec at 95°C, 7 sec at 62°C, and 16 sec at 72°C for 40 cycles. The specificity of the reaction was verified by sequencing the PCR product.

Western blot analysis of p53 expression.

Thymocytes were cultured for 4 hrs in the absence or in the presence of 10 µM of etoposide in RPMI supplemented with 10% FCS. Total proteins were prepared by lysis in non denaturing conditions. P53 was immunoprecipitated with the monoclonal antibody pAb246 and protG/agarose beads (InVitrogen). After migration onto a polyacrylamide gel and transfer onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad), p53 was revealed with the polyclonal FL393 reagent (Santa Cruz Biotechnology).

Statistical analysis

Statistical analysis of CD4/CD8 or CD2 expression between the different groups of mice was performed by a non parametric Mann-Whitney test using the Statview 5.0 (SAS Institute).

Results

1- γ -irradiation induces differentiation of immature $CD3\epsilon^{A5/A5}$ thymocytes

The induction of T cell development, assessed by the induction of CD4, CD8 and CD2 expression, was compared over a 3 weeks period in CD3-expressing (35, 36) RAG-2^{-/-}, and CD3-deficient $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice exposed to a single dose (6 Gy) of whole body irradiation. Thymic cellularity was found to evolve similarly in both types of mice. IR exposure first induces a sharp reduction in thymocyte numbers, followed by a slow recovery during the following weeks (Table 1). One week post irradiation, the fraction of cells with a CD4⁺CD8⁺ phenotype is still below 1%, i.e. similar to that found in un-irradiated control animals. IR-induced thymocyte differentiation then proceeds with the same kinetics whether CD3 is expressed or not: DP thymocytes become evident at 2 weeks, and their proportion increases until the third week after exposure. Of note, in both types of mice, IR exposure induces DP thymocytes development through an immature single positive (ISP) CD4⁺ stage, whereas in un manipulated wt C57BL/6 mice, ISP are rather CD8⁺. At both 2 and 3 weeks post irradiation, the proportion of DP thymocytes in irradiated $CD3\epsilon$ -deficient mice is about half of that found in RAG-2^{-/-} mice (Fig 1A). Given that thymic cellularity is similar in both types of mice (Table 1), these results indicate that IR-induced thymocyte differentiation is less efficient when the CD3 complex is not expressed.

The proportion of cycling thymocytes is increased similarly in RAG-2^{-/-} and $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice when compared to un-irradiated controls. This increase is mainly due to a higher proportion of cells in S/G2/M in the ISP CD4 and DP compartments, where 13 to 15% of the cells are in the S/G2/M phase, compared to only 5 to 8% in un-irradiated and irradiated DN thymocytes (Fig 1B and data not shown). The apparition of DP thymocytes can therefore potentially result from the selective expansion of a few DN thymocytes in which IR exposure induced a deregulation of the mechanisms controlling cell survival and/or cycling. However, TCRB gene rearrangement in $CD3\epsilon^{A5/A5}$ mice 2 and 3 weeks post irradiation showed no obvious deviation from the profile found in un-irradiated control thymocytes (Fig 2). The relative intensity of the different bands is globally conserved, whereas clonal or oligoclonal expansion of a few cells with rearranged TCRB genes would have resulted in over-representation of one or a few BV/BJ combinations. These results indicate that the DP thymocytes that do develop in response to radiation exposure are polyclonal, and argue against the selective expansion of a few clones with altered survival/cycling checkpoints.

Absence of CD3 complex expression therefore reduces specifically the extent but not the timing of IR-induced immature thymocytes differentiation, and does not alter the cycling status of IR-induced SP CD4 and DP thymocytes. In addition, these results show that in irradiated RAG-mice, DP development following IR exposure results from the additive activation of at least two signaling pathways, one dependent and one independent of CD3 complex expression.

2-Dose response

To determine whether these CD3-dependent and CD3-independent pathways have the same sensitivity to lower doses of radiation (27, 31), RAG-2^{-/-} and CD3ε^{Δ5/Δ5} mice were exposed to 4 Gy of IR. Three weeks later, the proportion of DP thymocytes was only marginally reduced (66% at 4 Gy vs 74.2% at 6 Gy) in irradiated RAG-2^{-/-} mice, whereas it was sharply reduced in irradiated CD3ε^{Δ5/Δ5} mice (8.9% at 4 Gy vs 44.2% at 6 Gy) when compared to 6 Gy irradiated animals (Fig 3 and Table 1). Thus, in these conditions, IR-induced differentiation is less potent in absence of CD3 complex expression. A stronger stimulation is required to substantially induce DP thymocyte development. To further investigate whether other mutations affecting components of the proximal pre-TCR signaling pathway have a similar effect, we analyzed IR-induced differentiation in LAT mutated mice.

In irradiated LAT^{-/-} animals, DP development following 4 Gy irradiation (13.1%) was found to be, on average, similar to that found in irradiated CD3ε-deficient mice (8.9%). However, inter-individual variations were very important: the percentage of DP thymocytes in individual irradiated mice ranges from 0.3 to 50%. The effects of radiation exposure seem stochastic. A different situation emerged from the analysis of irradiated LAT3Y animals. In these mice, the proportion of DP thymocytes (5.1%) was found to be consistently very low and, on average, not statistically different ($p>0.05$) from that found in un-irradiated mice (Fig 3). Therefore, whereas in the absence of LAT expression, IR exposure randomly induces variable levels of DP thymocyte in some, but not all exposed animals, expression of the membrane bound LAT3Y molecule impedes IR-induced thymocyte development in all irradiated mice. The mutation of the three tyrosine residues appears to confer a dominant negative behaviour to the LAT3Y molecule.

3- CD2 induction is not affected by CD3 inactivation

In wt mice, CD2 expression is up regulated on developing thymocytes at the time of pre-TCR-induced DN to DP transition (3, 5). In un-irradiated RAG-2^{-/-} and CD3ε-deficient mice, only a minor fraction of DN thymocytes expresses this marker. The majority of these CD2⁺ cells are CD44⁺25⁺NK1.1⁺ NK cells (Fig 4A and data not shown). One week after IR exposure, CD2 expression is already significantly up-regulated on RAG-2^{-/-} and CD3ε^{Δ5/Δ5} thymocytes, when no DP cells have yet developed (Table 1). This increase does not result from the expansion of NK cells following irradiation, as FACS analysis shows that this up-regulation takes place on CD25⁺NK1.1⁻ thymocytes (Fig 4A and data not shown). At 2 weeks post irradiation, the proportion of CD2⁺ thymocytes sharply increases in both type of irradiated mice, irrespective of CD3 expression, and by the third week, the vast majority of the cells do express CD2 (Fig 4B and Table 1). Thus, neither the timing nor the extent of the up-regulation of CD2 expression in irradiated mice is affected by CD3ε inactivation. Our results also show that CD2 expression is induced on DN3 thymocytes before the differentiation of DP cells, both in RAG-2^{-/-} and CD3ε^{Δ5/Δ5} mice, and therefore demonstrate the temporal dissociation of pre-TCR

like signals responsible for these events. Both of these signals are integrated and transduced into the cell through LAT, as CD2 expression is not significantly up-regulated in irradiated LAT^{-/-} or irradiated LAT3Y when compared to un-irradiated controls (data not shown).

4-Origin of TCRA rearrangement

We previously observed an increased level of rearranged TCRA genes in thymocytes from 3 weeks-irradiated (6 Gy) CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice. After DN and DP thymocytes were sorted, a high level of rearranged TCRA genes was clearly found only in sorted DP but not sorted DN thymocytes (data not shown). The increased level of TCRA gene rearrangement observed in response to IR exposure therefore appears to be a specific event induced in developing thymocytes at the time of IR-induced DN to DP differentiation or after the cells reach the DP compartment.

To further demonstrate that this increased level of rearranged TCRA genes results from *de novo* recombination, we analyzed signal joints (SJ) produced during TCRA gene rearrangement in un-irradiated and irradiated CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice. SJ are generated by ligation of the rearranged genes RSS. After deletional recombination, SJ formation creates an episomal structure (T cell receptor excision circle, TREC) which is not replicated during cell division. Hence, an increase in TREC level reflects an increase in V(D)J recombination activity. SJs resulting from the rearrangement of ADV2, ADV6 and ADV8 genes or gene families were readily detected in 2 and 3 wks-irradiated (6 Gy) CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ thymocytes, whereas they were not found in un-irradiated samples (Fig 5A). Similarly, we could also amplify SJ resulting from the rearrangement of the δ Rec-1 element with the AJ61 gene from IR-induced, but not control CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ thymocytes (Fig 5B). Real time PCR quantification of δ Rec-1/AJ61 SJ level showed that the level of this rearrangement in irradiated CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ thymocytes is only about one fifth to one tenth of the level found in wt thymocytes (Table 2). Thus, although IR-induced thymocyte differentiation is accompanied by a concomitant increase in TRCA SJ level, the majority of the thymocytes that do differentiate to the DP compartment do not rearrange their TCRA genes. This finding suggests that an additional signal, not provided during the response elicited following IR-exposure, is required for this event to proceed.

5-Long term effects of IR exposure

Finally, we wanted to determine the long term effects of IR-exposure on thymocyte development. To this end, irradiated CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice were sacrificed 14, 15 and 16 weeks post irradiation (6 Gy). A large proportion of DP thymocytes, ranging from 36 to 95%, was found in 4 out of 7 animals tested (Table 3). Furthermore, the 3 animals with the larger DP compartment clearly have an enlarged thymus, with a cellularity ranging from 23 to 169 x 10⁶ cells per thymus. Analysis of TCR BV-BJ rearrangement from thymocyte DNA prepared from these animals revealed a very un-even, distorted pattern, where one or two bands predominate, whereas the other are very weak or absent (Fig 6). This

profile denotes the polyclonal expansion of a small number of thymocytes with rearranged TCRB genes. It was not observed at early times (1, 2 and 3 weeks) post irradiation (Fig 2). This difference indicates either that the proliferation of a few clones was not strong enough at these times to induce visible changes in the pattern of BV/BJ rearrangement, or that expansion affected BV-BJ combinations different than the one we tested, or that in these mice, no oligoclonal lymphoproliferation took place.

It was previously suggested that IR-induced immature thymocyte differentiation resulted from IR-induced inactivation of the tumor suppressor protein p53 and, consequently, the loss of the checkpoint functions enforced by this protein including apoptosis induction in absence of pre-TCR-derived survival signal. However, when thymocytes from the 16 wks irradiated animal #1 were treated ex vivo with the DNA topoisomerase inhibitor etoposide, we could readily detect an increase in the level of p53 protein (Fig 7A). This protein is active, as transcription of p21^{waf}, one of p53 target genes following genotoxic stress exposure is up-regulated (data not shown). Finally, an increase in annexin V staining is evident as early as 3 hrs after exposure these cells to a 6 Gy dose of γ -radiation, indicating that they are able to develop a radio-induced apoptotic reaction (Fig 7B).

Altogether, these data show that, in about one half of the CD3 ϵ ^{$\Delta 5/\Delta 5$} mice analyzed, IR induces a transitory rescue of T lymphocyte development. In the other half, DP thymocytes persist and can be found up to 16 weeks post irradiation, resulting from the oligoclonal expansion of a few clones. In at least one case, the mechanisms responsible for this lymphoproliferation preserve the p53-dependent IR-response pathway.

Discussion

In this study, we show that γ -irradiation exposure induces differentiation of immature quiescent CD2⁻ DN3 thymocytes into more mature, cycling CD2⁺ DP cells both in RAG-2^{-/-} and in CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice. In CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice, *de novo* induction of TCRA gene rearrangement coincides with IR induced thymocyte maturation. Thus, the response elicited by IR-exposure recapitulates several of the events associated with pre-TCR signaling in pre-TCR deficient mice. The kinetics of DP thymocyte maturation and CD2 up-regulation are not affected by the absence of the CD3 complex expression. However, the proportion and number of DP thymocytes generated in irradiated CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ mice is only half of that generated in RAG-2 deficient mice, whereas the proportion and number of CD2⁺ thymocytes are similar in both strains. Finally, the development of DP thymocytes is essentially abrogated in absence of a functional LAT molecule. These results indicate that i) CD3 complex expression is required for IR-induced immature thymocytes to be fully effective, ii) in RAG-2-deficient mice, IR-induced immature thymocyte differentiation is the result from the additive activation of 2 signaling pathways, one dependent and one independent of CD3 complex expression, and these pathways converge toward LAT, and iii) signaling pathways leading to differentiation of DN thymocytes until the DP stage on the one hand, and on induction of CD2 expression on the other hand, activated concurrently at the time of pre-TCR expression in wt thymocytes, are dissociated in response to IR exposure.

Irradiation is a very broad, non specific, stimulus inducing both oxidative and genotoxic stress. Accordingly, its effects are pleiotropic. IR-induced oxidative stress for example has been shown to alter the biophysical properties of the cellular membrane by increasing simultaneously the fluidity of the lipid compartment and the rigidity of the lipid-protein interface (37). Oxidative stress has also been shown to induce activation/inactivation of protein kinases and protein phosphatases (38, 39). In Jurkat T cells, which express a functional TCR/CD3 complex, ZAP-70 is phosphorylated in response to H₂O₂ or UV exposure (40), and H₂O₂ treatment results in ZAP-70-dependent ERK1/2 activation (41). Thus, in mice with impaired TCRB gene rearrangement, IR-induced rescue of immature pre-TCR-deficient thymocytes differentiation may result from membrane reorganization that would bring in close proximity, within the same lipid rafts, the CD3 complex and proximal signaling components of the pre-TCR complex such as p56^{lck}. This approximation could in turn induce phosphorylation of the ITAM motives borne by the CD3 chain intra cellular domains. Owing to the low activation threshold of DN thymocyte (42), this event is sufficient to trigger, through ZAP-70 and LAT, the signaling cascade leading to DP thymocyte development (43). Inactivation of p56^{lck} was shown to reduce the extent of IR-induced thymocyte differentiation in RAG-1-deficient mice (30). In this study, the generation of DP thymocytes is also reduced in irradiated CD3 $\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ when compared to irradiated RAG-2^{-/-} mice, and almost totally abrogated in irradiated LAT mutated mice (21). In both cases, absence of membrane or membrane-proximal proteins involved in pre-TCR signaling reduces the

response to irradiation. Of note, the effects of LAT inactivation depend on whether the protein is still expressed or not. In irradiated LAT^{-/-} mice, we observed important inter-individual variations in the induction of DP thymocytes development and CD2 expression appears essentially random. The firing of pre-TCR-like signals seems to depend mostly on the chance activation of one of the distal, “post LAT”, components of the signaling cascade. In LAT 3Y mice, the situation is different. The mutated LAT molecule expressed in these animals does not support DP thymocyte development. It does however support $\gamma\delta$ lymphocyte development (21). Thus, although the LAT3Y molecule is able to coordinate a partially functional signaling complex, IR exposure has no effects on immature lymphocyte development. The LAT3Y molecule seems to sequester components of pre-TCR signaling in this partially functional complex and reduces their probability of triggering, by chance activation, DP thymocyte development. By acting as a scaffold bringing together “post LAT” effectors of pre-TCR signaling in a complex that cannot be activated, the membrane bound LAT3Y protein adopts a dominant negative behavior.

Notwithstanding, DP thymocytes do develop in irradiated CD3 ϵ ^{$\Delta 5/\Delta 5$} mice, in spite of the absence CD3 complex expression at the cell surface of DN thymocytes. However, the TCR ζ chains can be expressed independently of CD3 or pre-TCR complexes (44). Thus, in CD3 ϵ ^{$\Delta 5/\Delta 5$} immature thymocytes, IR might induce, via p56^{lck} and/or p59^{fyn}, TCR ζ chain ITAMs phosphorylation and, through ZAP-70 recruitment and LAT phosphorylation, activation of downstream effectors of the pre-TCR and immature thymocyte differentiation. Our results then indicate that in presence of the TCR ζ chain alone, IR does not induce the full complement of activating signals, or does not induce signals of a sufficient strength/duration, required to attain the level of IR-induced differentiation observed in RAG-2^{-/-} mice, which express both the CD3 complex and the TCR ζ chain. Moreover, in irradiated CD3-deficient mice, only a fraction of the DP has rearranged their TCRA genes. Therefore, the differentiation of CD3 ϵ ^{$\Delta 5/\Delta 5$} immature thymocytes to the DP stage in response to IR does not obligatorily result in TCRA gene rearrangement. This dissociation of two events normally associated during thymocyte differentiation following pre-TCR signaling indicates again that the full complement of activation/differentiation signals is not delivered in absence of expression of the CD3 complex or that these signals are not potent enough. This notion that a threshold of activating signals needs to be reached to initiate the response is further supported by the fact that IR-induced DP thymocyte development is IR dose-dependent: exposure to a dose of 6 Gy results in more DP thymocytes than exposure to a dose of 4 Gy, and a dose of 1.5 Gy has no effects on thymocyte maturation in p53 expressing mice. A similar dose dependence was also found during the study of IR-induced membrane re-organization (37).

Interestingly, CD2 expression, which is concomitant with DP thymocyte development following pre-TCR signaling in wt mice is induced similarly in irradiated CD3 ϵ ^{$\Delta 5/\Delta 5$} and irradiated RAG-2^{-/-} mice. Whatever the exact nature of the signals activated by IR, CD3 complex inactivation affects IR

induction of CD4/CD8, but not of CD2 expression. Furthermore, both in RAG-2^{-/-} and CD3 ϵ ^{Δ 5/ Δ 5} mice, CD2 up-regulation is already evident 8 days post irradiation, when no DP thymocytes have yet developed. IR induces CD2 expression already on DN thymocytes, and unlike progression to the DP stage, CD2 expression following IR exposure is independent of CD3 expression. Thus, although CD4/CD8 and CD2 expression are coordinately regulated during normal T cell differentiation, they are dissociated during IR-induced immature thymocytes maturation, both in the presence and in the absence of CD3 expression. This result indicates that the signaling pathways activated after irradiation leading to their up-regulation are likely to be distinct and use different effectors, either because they branch out as they are transduced into the cell, or because irradiation activates multiple independent signaling pathways. Indeed, although pre-TCR proximal signaling events are relatively well established, the distal effectors are still not clearly defined. Multiple signaling pathways, when inactivated, impair one or more aspects of pre-TCR-induced thymocyte development (45). The expression of numerous DNA binding proteins/transcription factors is modulated while immature DN3 thymocyte progress to the DP compartment through the DN4 stage (19), and it is likely that some of these factors have partially redundant activities and/or act in coordination to produce synergistic effects. For example, in an in vitro model of immature thymocyte maturation, traversal of the β selection checkpoint results in up regulation of Egr1, Egr2 and Egr3 transcription (46). However, when over expressed individually, each of the Egr proteins is able to induce to some extent different aspects of immature thymocyte maturation, but it seems that only the coordinated action of these three proteins is able to fully reproduce the effects of pre-TCR signaling (46, 47). Similarly, our results show that the effectors of both the CD3-dependent and the CD3-independent pathways for IR-induced thymocyte differentiation have a similar spectrum of activities, in that they can both induce several aspects of pre-TCR signaling (induction of CD2 expression, differentiation to the DP stage, cycling) and are therefore partially redundant. However, the extent, but not the kinetics, of DP thymocyte maturation is regulated differentially in the presence and in the absence of the CD3 complex, whereas induction of CD2 expression is not affected. Therefore, in response to IR-exposure, pre-TCR like signals initiated upstream of LAT are un-coordinated. These results suggest in wt thymocytes, the pre-TCR-associated CD3 complex is required for the proper integration and coordination of multiple signaling pathways controlling different aspects of T lymphocyte development.

We recently showed that IR induced thymocyte differentiation proceeds either by a p53-dependent or a p53-independent pathway (31). The observations reported in this paper document the p53-dependent pathway. We previously showed that IR induced CD3 ϵ -deficient DP thymocytes do retain a functional p53 molecule in 3 wks irradiated mice. We now show that 16 wks post irradiation, DP thymocytes from a mouse in which lymphoproliferation and oligoclonal expansion were evident, are still able to mount a p53-dependent response following genotoxic stress exposure. Together, these data definitively demonstrate that p53 inactivation is not a pre-requisite condition for IR-induced thymocyte differentiation, as suggested (29). Therefore, a p53-dependent, IR-induced response takes

place in irradiated DN3 thymocyte, and this response influences the fate of these cells. As previously shown only p53-deficient immature thymocytes do develop when exposed to low dose radiation (31). When activated by post-transcriptional modifications in response to genotoxic stress such as IR, the p53 tumor suppressor protein becomes a transcription factor able to induce or repress the expression of numerous target genes. The activation of p53 in immature thymocytes is likely to affect the delicate balance of the regulatory networks controlling lymphocyte development at different levels. For example, p53 may regulate the expression of T cell specific genes, either directly (48) or through the action of its target genes. Also, as p53 activity requires transcriptional factors/co-factors like CBP/p300 (49), these factors may be sequestered away from their physiological target sites, therefore inducing the dys-regulation of gene expression in developing thymocytes. Recent evidences indeed suggest that these effects can be combined to act on the Notch1 signaling pathway in thymocytes (50). Following Notch1 engagement, the presenilin 1 (PS1) protein cleaves and releases the Notch1 intra cellular domain (N^{ic}), which induces transcription of Notch1 target genes. Activated p53 not only suppresses PS1 expression (51) but also competes with N^{ic} for the binding and the co-activation function of CBP/p300 (52). These combined effects may attenuate the effects of Notch1 signaling in radio-resistant thymocytes and allow their differentiation past the DN3 stage in the absence of pre-TCR derived signals (53).

Altogether, our results show that IR-induced thymocyte differentiation results both from CD3-dependent and CD3-independent pathways. The propagation of survival/differentiation signals into the cell following activation of these pathways requires the expression of a functional membrane bound LAT molecule. Events tightly linked and co-regulated during traversal of the β selection checkpoint (CD2 induction and differentiation to the DP stage, differentiation to the DP stage and TCRA gene rearrangement) are dissociated in irradiated CD3-deficient mice, suggesting that they are under the control of different effectors in wt thymocytes. Therefore, assembly of the pre-TCR complex is necessary for the adequate integration and coordination within immature thymocytes of multiple signaling pathways. In the context of p53 expressing mice, IR-induced immature thymocyte differentiation probably results from a combination of pre-TCR-like signals generated by IR-induced membrane reorganization, modulated by the cellular re-programming of gene transcription and expression orchestrated by activated p53 during the response to genotoxic stress. Together, these processes allow immature pre-TCR deficient DN3 thymocyte to overcome the blockade imposed by the lack of pre-TCR derived differentiation/survival signals and progress until the DP compartment.

Acknowledgments

We want to thank Irène Maréchal, Nicolas Chaumontel and Sylvie Richelme for animal care.

References

1. Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150:4244.
2. Godfrey, D. I., J. Kennedy, P. Mombaerts, S. Tonegawa, and A. Zlotnik. 1994. Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation. *J.Immunol.* 152:4783.
3. Yagita, H., J. Asakawa, S. Tansyo, T. Nakamura, S. Habu, and K. Okumura. 1989. Expression and function of CD2 during murine thymocyte ontogeny. *Eur.J.Immunol.* 19:2211.
4. von Boehmer, H., and H. J. Fehling. 1997. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 15:433-52:433.
5. Rodewald, H. R., K. Awad, P. Moingeon, L. D'Adamio, D. Rabinowitz, Y. Shinkai, F. W. Alt, and E. L. Reinherz. 1993. Fc gamma RII/III and CD2 expression mark distinct subpopulations of immature CD4-CD8- murine thymocytes: in vivo developmental kinetics and T cell receptor beta chain rearrangement status. *J.Exp.Med.* 177:1079.
6. Koretzky, G. A., and P. S. Myung. 2001. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* 1:95.
7. van Oers, N. S., H. von Boehmer, and A. Weiss. 1995. The pre-T cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR-zeta subunit. *J.Exp.Med.* 182:1585.
8. Michie, A. M., S. Trop, D. L. Wiest, and J. C. Zuniga-Pflucker. 1999. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by the pre-T cell receptor in developing thymocytes in vivo. *J.Exp.Med.* 190:1647.
9. Groves, T., P. Smiley, M. P. Cooke, K. Forbush, R. M. Perlmutter, and C. J. Guidos. 1996. Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity.* 5:417.
10. van Oers, N. S., B. Lowin-Kropf, D. Finlay, K. Connolly, and A. Weiss. 1996. alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity.* 5:429.
11. Cheng, A. M., I. Negishi, S. J. Anderson, A. C. Chan, J. Bolen, D. Y. Loh, and T. Pawson. 1997. The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:9797.
12. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* 68:869.
13. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, and A. M. Stall. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855.
14. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO.J.* 14:4641.
15. DeJarnette, J. B., C. L. Sommers, K. Huang, K. J. Woodside, R. Emmons, K. Katz, E. W. Shores, and P. E. Love. 1998. Specific requirement for CD3epsilon in T cell development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:14909.
16. Wang, B., N. Wang, M. Salio, A. Sharpe, D. Allen, J. She, and C. Terhorst. 1998. Essential and partially overlapping role of CD3gamma and CD3delta for development of alphabeta and gammadelta T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 188:1375.

17. Wang, B., N. Wang, C. E. Whitehurst, J. She, J. Chen, and C. Terhorst. 1999. T lymphocyte development in the absence of CD3 epsilon or CD3 gamma delta epsilon zeta. *J.Immunol.* 162:88.
18. Newton, K., A. W. Harris, and A. Strasser. 2000. FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *Embo J* 19:931.
19. Tabrizifard, S., A. Olaru, J. Plotkin, M. Fallahi-Sichani, F. Livak, and H. T. Petrie. 2004. Analysis of transcription factor expression during discrete stages of postnatal thymocyte differentiation. *J Immunol* 173:1094.
20. Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P. E. Love, and L. E. Samelson. 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity.* 10:323.
21. Nunez-Cruz, S., E. Aguado, S. Richelme, B. Chetaille, A. M. Mura, M. Richelme, L. Pouyet, E. Jouvin-Marche, L. Xerri, B. Malissen, and M. Malissen. 2003. LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* 4:999.
22. Murphy, W. J., S. K. Durum, M. R. Anver, D. K. Ferris, D. W. McVicar, J. J. O'Shea, S. K. Ruscetti, M. R. Smith, H. A. Young, and D. L. Longo. 1994. Induction of T cell differentiation and lymphomagenesis in the thymus of mice with severe combined immune deficiency (SCID). *J.Immunol.* 153:1004.
23. Danska, J. S., F. Pflumio, C. J. Williams, O. Huner, J. E. Dick, and C. J. Guidos. 1994. Rescue of T cell-specific V(D)J recombination in SCID mice by DNA-damaging agents. *Science* 266:450.
24. Bogue, M. A., C. Zhu, E. Aguilar-Cordova, L. A. Donehower, and D. B. Roth. 1996. p53 is required for both radiation-induced differentiation and rescue of V(D)J rearrangement in scid mouse thymocytes. *Genes Dev.* 10:553.
25. Livak, F., S. C. Welsh, C. J. Guidos, I. N. Crispe, J. S. Danska, and D. G. Schatz. 1996. Transient restoration of gene rearrangement at multiple T cell receptor loci in gamma-irradiated scid mice. *J.Exp.Med.* 184:419.
26. Binnie, A., S. Olson, G. E. Wu, and S. M. Lewis. 1999. Gamma-irradiation directly affects the formation of coding joints in SCID cell lines. *J.Immunol.* 163:5418.
27. Guidos, C. J., C. J. Williams, G. E. Wu, C. J. Paige, and J. S. Danska. 1995. Development of CD4+CD8+ thymocytes in RAG-deficient mice through a T cell receptor beta chain-independent pathway. *J.Exp.Med.* 181:1187.
28. Zuniga-Pflucker, J. C., D. Jiang, P. L. Schwartzberg, and M. J. Lenardo. 1994. Sublethal gamma-radiation induces differentiation of CD4-/CD8- into CD4+/CD8+ thymocytes without T cell receptor beta rearrangement in recombinationase activation gene 2-/- mice. *J.Exp.Med.* 180:1517.
29. Jiang, D., M. J. Lenardo, and C. Zuniga-Pflucker. 1996. p53 prevents maturation to the CD4+CD8+ stage of thymocyte differentiation in the absence of T cell receptor rearrangement. *J.Exp.Med.* 183:1923.
30. Wu, G., J. S. Danska, and C. J. Guidos. 1996. Lck dependence of signaling pathways activated by gamma- irradiation and CD3 epsilon engagement in RAG-1(-/-)-immature thymocytes. *Int.Immunol.* 8:1159.
31. Candeias, S. M., S. J. Mancini, C. Tuvrey, E. Borel, E. Jouvin-Marche, and P. N. Marche. 2004. p53-dependent and p53-independent pathways for radiation-induced immature thymocyte differentiation. *Oncogene* 23:1922.
32. Mancini, S., S. M. Candéias, H. J. Fehling, H. von Boehmer, E. Jouvin-Marche, and P. N. Marche. 1999. TCR alpha-chain repertoire in pTalpha-deficient mice is diverse and developmentally regulated: implications for pre-TCR functions and TCRA gene rearrangement. *J.Immunol.* 163:6053.

33. Schmid, I., S. W. Cole, J. A. Zack, and J. V. Giorgi. 2000. Measurement of lymphocyte subset proliferation by three-color immunofluorescence and DNA flow cytometry. *J Immunol Methods* 235:121.
34. Rabinovitch, P. S., R. M. Torres, and D. Engel. 1986. Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation: applications to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. *J Immunol* 136:2769.
35. Jacobs, H., D. Vandeputte, L. Tolkamp, E. de Vries, J. Borst, and A. Berns. 1994. CD3 components at the surface of pro-T cells can mediate pre-T cell development in vivo. *Eur.J.Immunol.* 24:934.
36. Shinkai, Y., and F. W. Alt. 1994. CD3 epsilon-mediated signals rescue the development of CD4+CD8+ thymocytes in RAG-2-/- mice in the absence of TCR beta chain expression. *Int.Immunol.* 6:995.
37. Benderitter, M., L. Vincent-Genod, A. Berroud, S. Muller, M. Donner, and P. Voisin. 1999. Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? *Int J Radiat Biol* 75:1043.
38. Herrlich, P., and F. D. Bohmer. 2000. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 59:35.
39. Tonks, N. K. 2005. Redox Redux: Revisiting PTPs and the Control of Cell Signaling. *Cell* 121:667.
40. Schieven, G. L., R. S. Mittler, S. G. Nadler, J. M. Kirihara, J. B. Bolen, S. B. Kanner, and J. A. Ledbetter. 1994. ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H2O2-induced T cell signal transduction. *J.Biol.Chem.* 269:20718.
41. Griffith, C. E., W. Zhang, and R. L. Wange. 1998. ZAP-70-dependent and -independent activation of Erk in Jurkat T cells. Differences in signaling induced by H2O2 and Cd3 cross- linking. *J.Biol.Chem.* 273:10771.
42. Haks, M. C., S. M. Belkowski, M. Ciofani, M. Rhodes, J. M. Lefebvre, S. Trop, P. Hugo, J. C. Zuniga-Pflucker, and D. L. Wiest. 2003. Low activation threshold as a mechanism for ligand-independent signaling in pre-T cells. *J Immunol* 170:2853.
43. Norment, A. M., K. A. Forbush, N. Nguyen, M. Malissen, and R. M. Perlmutter. 1997. Replacement of pre-T cell receptor signaling functions by the CD4 coreceptor. *J.Exp.Med.* 185:121.
44. Grassi, F., E. Barbier, S. Porcellini, H. von Boehmer, and P. A. Cazenave. 1999. Surface expression and functional competence of CD3-independent TCR zeta-chains in immature thymocytes. *J.Immunol.* 162:2589.
45. Michie, A. M., and J. C. Zuniga-Pflucker. 2002. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol* 14:311.
46. Carleton, M., M. C. Haks, S. A. Smeele, A. Jones, S. M. Belkowski, M. A. Berger, P. Linsley, A. M. Kruisbeek, and D. L. Wiest. 2002. Early growth response transcription factors are required for development of CD4(-)CD8(-) thymocytes to the CD4(+)CD8(+) stage. *J Immunol* 168:1649.
47. Xi, H., and G. J. Kersh. 2004. Early growth response gene 3 regulates thymocyte proliferation during the transition from CD4-CD8- to CD4+CD8+. *J Immunol* 172:964.
48. Bourdon, J. C., V. Deguin-Chambon, J. C. Lelong, P. Dessen, P. May, B. Debuire, and E. May. 1997. Further characterisation of the p53 responsive element-- identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 14:85.
49. An, W., J. Kim, and R. G. Roeder. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* 117:735.

50. Laws, A. M., and B. A. Osborne. 2004. p53 regulates thymic Notch1 activation. *Eur J Immunol* 34:726.
51. Roperch, J. P., V. Alvaro, S. Prieur, M. Tuynder, M. Nemani, F. Lethrosne, L. Piouffre, M. C. Gendron, D. Israeli, J. Dausset, M. Oren, R. Amson, and A. Telerman. 1998. Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression. *Nat Med* 4:835.
52. Oswald, F., B. Tauber, T. Dobner, S. Bourteele, U. Kostezka, G. Adler, S. Liptay, and R. M. Schmid. 2001. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol Cell Biol* 21:7761.
53. Wolfer, A., T. Bakker, A. Wilson, M. Nicolas, V. Ioannidis, D. R. Littman, P. P. Lee, C. B. Wilson, W. Held, H. R. MacDonald, and F. Radtke. 2001. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2:235.

Footnotes

This work was supported by institutional grants from the « Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale » and the « Commissariat à l'Energie Atomique ». CT was supported by a fellowship from the « Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche » and by a grant from « L'Association pour la Recherche contre le Cancer ». S. J. C. M. was supported by grant from « La Ligue Nationale pour la Recherche contre le Cancer ».

Abbreviations:

DN: double negative; DP: double positive; IR: ionizing radiation; Gy: gray; wt: wild type; PTK: protein tyrosine kinase; SJ: signal joint; TREC: T cell receptor excision circle.

Figure legends :

Figure 1: **A: IR exposure induces immature pre-TCR-deficient thymocyte differentiation.** The CD4/CD8 profiles of control (top) and irradiated (bottom) RAG-2^{-/-} (left) and CD3ε^{Δ5/Δ5} (right) animals are shown. The percentage of DP thymocyte in irradiated mice is indicated in the relevant quadrant. **B: Cell cycle analysis of IR induced thymocytes.** The percentages of cells in the S/G2/M phases of the cell cycle was measured by FACS analysis in irradiated RAG-2^{-/-} (black bars) and CD3ε^{Δ5/Δ5} (hatched bars) thymocytes.

Figure 2: **PCR analysis of TCRB gene rearrangement in control and irradiated CD3ε^{Δ5/Δ5} mice.** Genomic DNA prepared from control (left) and 2 and 3 wks irradiated mice (lanes labelled 2 and 3, respectively) was amplified with primers specific for the BV8 gene family and for BJ2S6. The identity of the rearranged BJ2 genes is indicated on the left.

Figure 3: **DP thymocyte development in 4 Gy irradiated mice.** DP thymocyte development, assessed by FACS analysis, was determined in control (black bars) and irradiated (grey bars) RAG-2^{-/-} (RAG), LAT^{-/-} (LAT KO), LAT3Y and CD3ε^{Δ5/Δ5} (CD3) 3 wks after exposure to 4 Gy of γ-irradiation. For each strain, the numbers of control and irradiated animals analyzed are: 6 and 7 for RAG, 5 and 7 for LAT KO, 4 and 8 for LAT 3Y, and 20 and 13 for CD3.

Figure 4: **Induction of CD2 expression following IR-exposure.** **A:** One week post irradiation (6 Gy), CD2 expression is induced on NK1.1⁺ thymocytes in CD3ε^{Δ5/Δ5} mice. Similar results were obtained in irradiated RAG-2^{-/-} mice (data not shown). **B:** CD2 expression in control (thin line) and irradiated (3 wks, 6 Gy, thick line) RAG-2^{-/-} (left) and CD3ε^{Δ5/Δ5} (right) mice.

Figure 5: **Signal joints amplification.** **A:** Amplification of signal joints resulting from the rearrangement of ADV2, ADV6 and ADV8 genes with AJ58 in non-irradiated (lane 1), 6 Gy irradiated CD3ε^{Δ5/Δ5} mice (2 and 3 wks post irradiation, lanes 2 and 3) and a wt control animal (lane 4). Amplification of the p53 gene was used to check DNA input. **B:** Amplification of dRec-1/AJ61 signal joints from the thymus of an irradiated CD3ε^{Δ5/Δ5} animal, but not from the thymus of un-irradiated controls or RAG-2^{-/-} mice.

Figure 6: **PCR analysis of TCRB gene rearrangement in control and long term irradiated CD3ε^{Δ5/Δ5} mice.** Shown are the results of the amplification of BV8/BJ2 rearrangement, as in figure 2, from thymocyte DNA prepared from a non-irradiated control CD3ε^{Δ5/Δ5} and CD3ε^{Δ5/Δ5} mice 14, 15 and 16 wks post irradiation (6 Gy).

Figure 7: Ex vivo analysis of p53 expression and apoptosis induction in IR-induced DP thymocytes. **A:** Western blot analysis of p53 expression after immunoprecipitation of protein extracts prepared from un-treated (-) and treated (10 μ M etoposide, 4 hrs) thymocytes of the 16 wks#1 irradiated CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ animal. **B:** Increased Annexin V staining 3 hrs after exposure of thymocytes of the 16wks#1 irradiated mouse to a 6 Gy irradiation.

Table 1

mice	treatment	cells/thymus ^{&} ± SD (x10 ⁶)	% DP thymocytes [#] ± SD	% CD2+ thymocytes [#] ± SD
RAG-2 ^{-/-}	none	6.7±2.0 (27)	0.4±0.4 (18)	7.1±2.4 (15)
	6 Gy, 1 wk	3.6±2.2 (6)	0.4±0.1 (3)	19.3±5.5 (3)
	6 Gy, 2 wks	3.3±1.9 (8)	20.5±9.8 (6)	77.6±16.6 (6)
	6Gy, 3 wks	8.8±3.6 (6)	74.2±21.3 (9)	74.2±21.5 (6)
CD3ε ^{Δ5/Δ5}	none	8.6±3.1 (27)	0.3±0.2 (20)	6.6±1.9 (21)
	6 Gy, 1 wk	3.7±1.0 (9)	0.2±0.03 (3)	17.4±3.7 (7)
	6 Gy, 2 wks	3.0±1.2 (15)	10.1±8.1 (13)	65.2±23.9 (15)
	6 Gy, 3 wks	7.9±3.9 (12)	44.2±15.8 (13)	84.0±15.2(8)

[&] Viable cells were numerated by acridin orange/ethidium bromide exclusion under UV light.

[#] The percentage of CD4⁺8⁺ and CD2⁺ thymocytes were determined by FACS analysis. Viable lymphoid cells were selected on the basis of forward and side scatter parameters. Numbers in brackets represent the number of mice analyzed for each parameter.

Table 2

	Mice	p53	δRec-1/AJ61
<u>Exp I</u>	C57BL/6	23.44	30.79
	Irr CD3ε ^{Δ5/Δ5}	23.45	35.50
<u>Exp II</u>	C57BL/6	23.36	23.83
	Irr CD3ε ^{Δ5/Δ5}	23.46	29.49

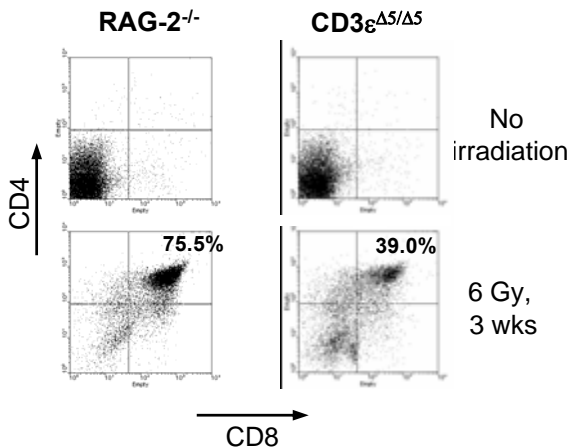
The level of δRec-1/AJ 61 was quantified in C57BL/6 and CD3ε^{Δ5/Δ5} thymocytes 3 wks post irradiation (6 Gy). Normalization of DNA input was verified by amplification at the same time of a fragment of the p53 gene. Values represent the number of the cycle at which the corresponding PCR product is first detected.

Table 3

Time post-irradiation Mice	14 wks		15 wks		16 wks		
	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#3
Cells per thymus (x 10 ⁻⁶)	3.6	4.77	23	4.2	169	43	9.6
%DP	0.2	36	95	2	92	79	2

Figure 1

A



B

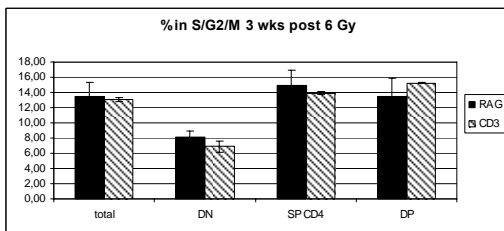


Figure 2

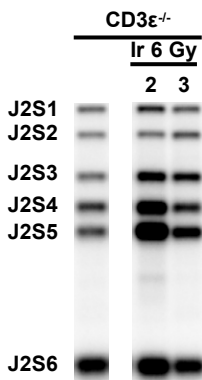


Figure 3

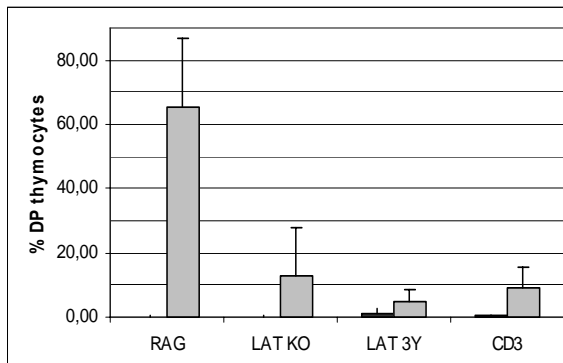
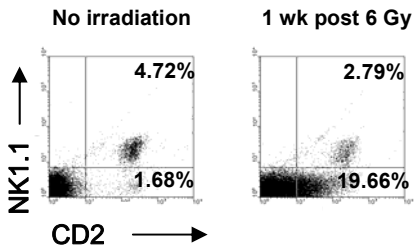


Figure 4

A



B

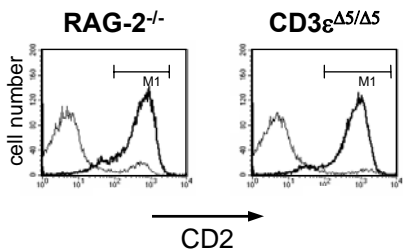


Figure 5

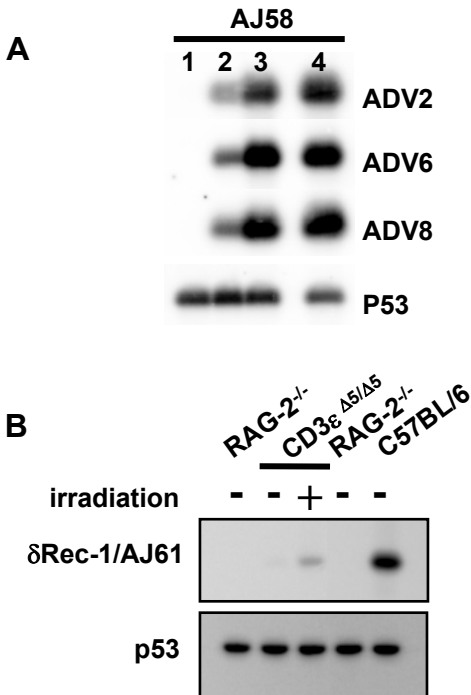


Figure 6

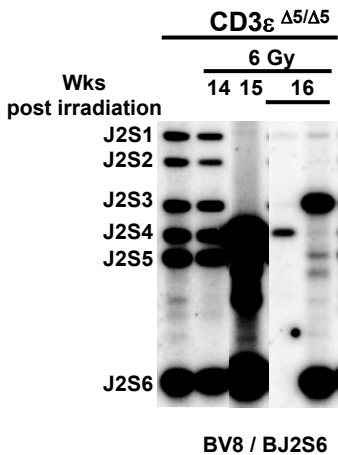
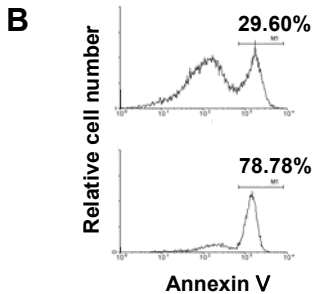
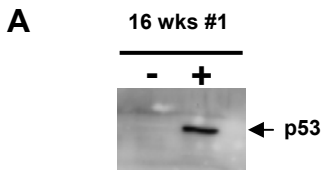


Figure 7



ARTICLE III

et données supplémentaires

**Gene specific signal joint modifications during V(D)J
recombination of murine and human TCRAD locus genes.**

Touvrey C, Borel E, Marche PN, Jouvin-Marche E, Candéias SM.

ARTICLE III
et données supplémentaires

Gene specific signal joint modifications during V(D)J recombination of murine and human TCRAD locus genes.

Touvrey C, Borel E, Marche PN, Jouvin-Marche E, Candéias SM.

La forte proportion des JS modifiée dans les souris sauvages était surprenante puisque la majorité de la littérature décrit le processus de ligation des EC comme un mécanisme « fidèle ». Quelques études avaient cependant fait état de modifications des JS formées lors du réarrangement des gènes TCRB, TCRD et TCRG. Cependant, aucune donnée concernant le réarrangement des gènes TCRA n'existait. Nous avons donc étudié de manière systématique et extensive les JS formées lors de la recombinaison des gènes du locus TCRAD.

L'analyse par digestion du produit d'amplification des JS formées lors du réarrangement ADV/AJ montre que quelles que soient les combinaisons testées, la proportion de produits résistants à la digestion est très nettement diminuée dans les thymocytes de souris TdT^{-/-} en comparaison avec les thymocytes de souris sauvages. L'activité de la TdT semble donc être responsable de la majorité de la diversité des JS formées lors du réarrangement des gènes TCRA. Le clonage et le séquençage de ces JS confirme que c'est bien l'addition de nucléotides N qui est à l'origine de cette diversité. De plus l'absence de nucléotides provenant de la partie codante des gènes TCR et la quasi absence de délétions montre que ces modifications ne sont pas imputables à une imprécision de coupure par la recombinaison. Le taux de modification (de 10 à 39%) semble dépendre du gène AJ utilisé par ADV2. Comme au niveau des JC (Nadel and Feeney, 1997), la séquence de la RSS semble influencer sur le traitement des extrémités signal. La même analyse a ensuite été effectuée à partir de JS formées lors du réarrangement des gènes codant pour une chaîne TCR δ . Ces jonctions sont aussi modifiées de manière prépondérante par l'action de la TdT. Cependant on constate une nette augmentation de l'incidence des délétions. La présence d'une activité exonucléasique au niveau des JS δ non retrouvée dans les JS α peu refléter :

1: L'existence d'une différence dans la composition et/ou l'activité des protéines du complexe postclivage entre les deux « locus ».

2: Que l'association post coupure des protéines RAG avec la RSS est moins étroite de par la différence de séquence des RSS ce qui rend la protection des ES moins efficace.

3: ces réarrangements prenant place à des stades différents de maturation des thymocytes, l'activité du complexe postclivage pourrait être régulée différemment.

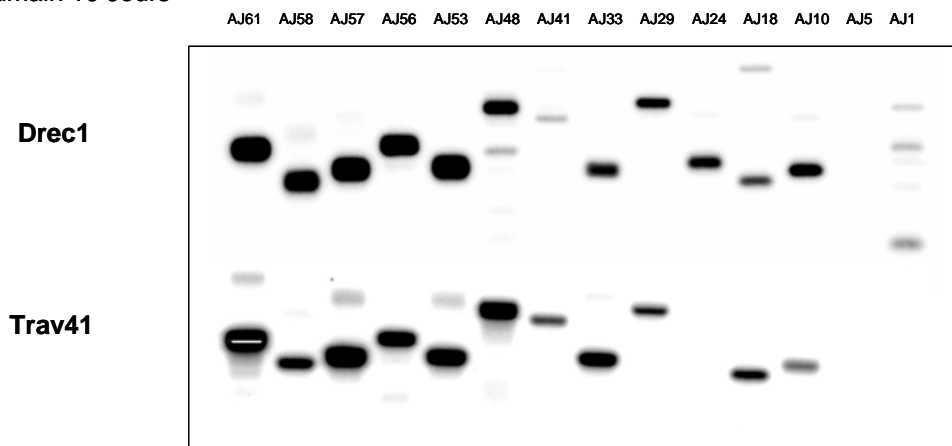
Nos résultats ne permettent pas de discriminer les deux premières hypothèses. Par contre la troisième possibilité peut probablement être écarté car les JS formées lors du réarrangement de DD1 et DD2 (partie résultats complémentaires) ne présentent pas de modifications par délétion. Le réarrangement entre δ Rec-1 et les gènes AJ chez l'homme comme chez la souris génère des JS modifiées de manière similaire.

L'ensemble de nos résultats ainsi que les résultats obtenus par d'autres groupes indiquent que loin d'être le fruit d'un processus aberrant de réparation, les modifications des JS sont en fait introduites par des protéines du complexe de la recombinaison V(D)J. La modification des JS représente donc une caractéristique intrinsèque de la recombinaison V(D)J. Le profil de modification pourrait donc servir de révélateur de la bonne marche de la recombinaison V(D)J comme le montre la partie résultat complémentaire.

Au cours de l'analyse extensive des JS nous avons analysé les JS formées lors du réarrangement de δ Rec-1. Le réarrangement de cet élément se fait à une forte fréquence chez l'homme et il serait impliqué dans le choix entre la lignée $\alpha\beta$ et la lignée $\gamma\delta$. La majorité des cellules $\alpha\beta$ présente une JS δ Rec-1/ AJ61. Chez la souris, cette fréquence est beaucoup plus faible. D'autres AJ peuvent servir d'accepteurs chez l'homme comme chez la souris. Chez la souris ces accepteurs semblent proximaux tandis qu'ils semblent répartis sur la région AJ chez l'homme. Aucune étude n'a cependant étudié la distribution exacte de ces accepteurs. Des données du laboratoire supportent une ouverture concentrique du locus TCRAD avec une utilisation préférentielle des AJ proximaux par les gènes ADV distaux chez la souris (Jouvin-Marche et al., 1998; Pasqual et al., 2002). δ Rec-1 étant situé en aval des gènes ADV étudiés nous nous sommes intéressés à son profil de réarrangement afin de déterminer si les règles de réarrangement des gènes codant pour la chaîne TCR α lui étaient applicables. Chez la souris, δ Rec-1 peut se réarranger avec une large partie du cluster de gène AJ puisque les JS impliquant δ Rec-1 et AJ18 sont facilement détectables (Figure 13B).

A/

Humain 10 Jours



B/

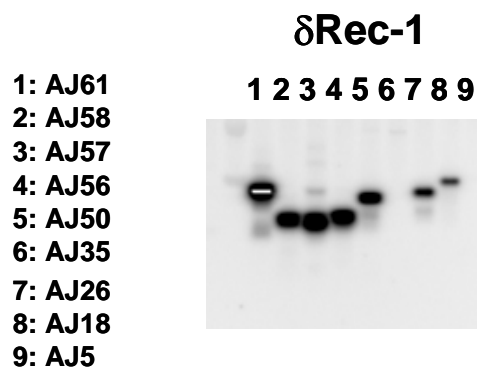


Figure 13: Caractérisation des accepteurs AJ de δ Rec-1 chez l'homme et la souris.

A/ Analyse des JC δ Rec-1/AJ dans des thymocytes humains et comparaison avec l'utilisation des AJ par le segment ADV le plus proche. **B/** Analyse des JS murines formées lors de la recombinaison de δ Rec-1 avec des segments AJ

Chez l'homme nous avons étudié directement la JC et il est possible de trouver δ Rec-1 réarrangé avec tous les gènes AJ testés entre AJ61 et AJ10. Cette utilisation très large des segments AJ n'est pas spécifique à δ Rec-1 puisque les gènes TRAV41 et TRAV40 situés à proximité sont aussi retrouvés réarrangé avec les mêmes segments (Figure 13A).

Les analyses par PCR quantitative révèlent cependant chez la souris une utilisation prédominante par δ Rec-1 de AJ61 et AJ58 et dans une moindre mesure AJ57 et AJ56. De manière intéressante les TRECs portant les JS formées lors du réarrangement de δ Rec-1/AJ58 sont plus abondants que ceux formés lors de la recombinaison de δ Rec-1 avec AJ61. On les

retrouve respectivement dans 12% et 8% des thymocytes. Les JS δ Rec-1/AJ57 ne sont présente que dans 2% des thymocytes et il est difficile de quantifier les JS δ Rec-1/AJ56 du fait de leur faible fréquence. La fréquence d'utilisation des segments AJ décroît donc avec leur éloignement de δ Rec-1. Cette régulation rappelle celle décrite par Pasqual et al concernant l'utilisation des gènes AJ par les gènes ADV. δ Rec-1 peut cependant utiliser un plus grand nombre de segments AJ que les gènes ADV situés à proximité.

Les 4 principales JS δ Rec-1/AJ sont donc retrouvées dans environ 20% des thymocytes murins (Figure 14). Cette fréquence est bien inférieure à celle de la JS δ Rec-1/AJ61 chez l'homme (80%). Il semble donc que cet évènement moléculaire ne soit pas l'évènement déclencheur de l'entrée des thymocytes dans la voie $\alpha\beta$ au contraire de ce qui est parfois suggéré chez l'homme.

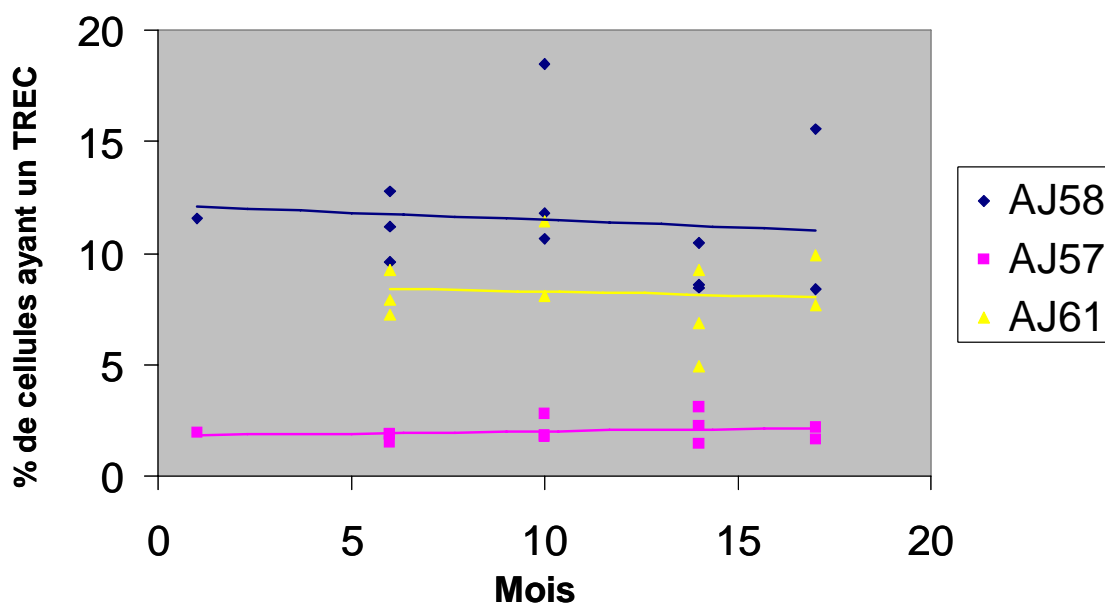


Figure 14: Quantification des JS δ Rec-1/AJ chez la souris. Le graphique indique le pourcentage de thymocytes « possédant » un cercle d'excision δ Rec-1/AJ. L'évolution de cette quantité au cours de l'âge de la souris est indiquée.

Ce réarrangement particulier pourrait par contre être impliqué dans la finalisation de l'engagement dans la voie LT $\alpha\beta$ en empêchant l'expression des gènes TCRD préalablement réarrangés. De manière complémentaire, ce réarrangement particulier pourrait aussi participer à l'accessibilité de la région AJ. Guo(Guo et al., 2002) et al ont développés une souris

surexprimant BCL-XL. Dans ces souris la durée de vie des LT DP est augmentée. L'étude des transcrits ADV/AC montre dans ces conditions un déplacement de l'utilisation des segments AJ des AJ proximaux aux AJ distaux. L'augmentation de la durée de vie des LT DP laisserait le temps aux LT d'effectuer des réarrangements secondaires ce qui permet des combinaisons ADV/AJ inhabituelles. De la même manière, dans la souris sauvage, le réarrangement de δ Rec-1 avec un segment AJ distal permettrait à la cellule l'utilisation d'une combinaison ADV/AJ « non disponible » autrement. Cette utilisation large des segments AJ par drec-1 pourrait ainsi servir à augmenter la diversité du répertoire TCR.

Gene specific signal joint modifications during V(D)J recombination of *TCRAD* locus genes in murine and human thymocytes

Cédric Touvrey, Eve Borel, Patrice N. Marche, Evelyne Jouvin-Marche and Serge M. Candéias

Laboratoire d'Immunochimie, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Commissariat à l'Energie Atomique-Grenoble, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 548, Université Joseph Fourier, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex, France.

Correspondance: Serge M. Candéias, Laboratoire d'Immunochimie, DRDC, INSERM U548, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex, France.

ph : +33 (0)4 38 78 92 49 ; fax : +33(0)4 38 78 98 03 ; e mail : immuno@dsvsud.cea.fr

Runing title: Junctional diversity in signal joints

Abbreviations: TCR: T cell receptor; RSS: recombination signal sequence; wt: wild type; SE: signal end; CE coding end; SJ signal joint; CJ coding joint; RAG: recombination activating gene; TdT: terminal nucleotidyl transferase; DNA-PK: DNA dependent protein kinase; DNA-PKcs: DNA-PK catalytic subunit; Art: Artemis; NHEJ: non homologous end joining

Keywords: V(D)J recombination; T cell receptor genes; signal joint; junctional diversity

Character count: 40490, excluding spaces

Abstract

V(D)J recombination assembles functional T cell receptor genes from V, D and J components in developing thymocytes. Extensive processing of V, D and J extremities before they are ligated creates a high degree of junctional diversity which results in the generation of a large repertoire of different TCR chains. In contrast, the extremities of the intervening DNA segment, which bear the recombination signal sequences targeting the recombination machinery to the genes are generally held to be monomorphic, so that signal joints (SJs) consist in the perfect head-to-head juxtaposition of the RSSs extremities. We analyzed the structure of SJs generated during the recombination of *TCRAD* locus gene in murine and human thymocytes. Junctional diversity resulting from N nucleotide additions or from N nucleotide additions and base loss was found for each type of SJ examined. Different patterns of processing/modification were found, suggesting that different enzymatic activities operate during recombination of *TCRA* and *TCRD* genes, although they are located within the same genetic locus. Recombination of the δ Rec-1 element generates a diverse repertoire of SJs exhibiting both combinatorial and junctional diversity in murine and human thymocytes. Therefore, SJ diversity appears to be an intrinsic feature of V(D)J recombination in un-manipulated thymocytes.

Introduction

Immunoglobulin (Ig) and T cell receptor (TCR) genes must be rearranged from discrete *V*, *D* and *J* gene segments before they are expressed on B and T lymphocytes, respectively (1). This recombination is mediated by the V(D)J recombinase complex which comprises only 3 lymphocyte specific proteins: the recombination activating genes (RAG) 1 and 2, and the terminal nucleotidyl transferase (TdT). The other enzymatic activities required for V(D)J recombination are provided by ubiquitously expressed proteins involved in DNA repair by non-homologous end joining (NHEJ): the DNA-dependent protein kinase complex (DNA-PK), formed by association of the Ku70/Ku86 heterodimer and the DNA-PKcs catalytic subunit, Artemis (Art), XRCC4 and the DNA ligase IV (2). The activity of the recombinase complex is specifically targeted to accessible *V*, *D* and *J* gene segments by the presence of recombination signal sequences (RSSs) at their borders (3). RSSs are short DNA motives consisting of a conserved heptamer (CACAGTG) and a semi conserved, AT-rich nonamer separated by a spacer of 12 or 23 bases (4, 5). V(D)J recombination is initiated when RSS-bound RAG proteins introduce a single strand nick exactly at the border of the gene and its RSS. This single strand nick generates a free 3'OH end. A nucleophilic attack of this free 3'OH on the opposite strand then induces a double strand break (DSB), with the gene coding end (CE) sealed in an hairpin structure and the RSS end blunt-ended and phosphorylated (6, 7). During the subsequent repair phase of V(D)J recombination, CEs are processed before they are ligated together by NHEJ proteins (1, 2). Hairpin opening, the first step of this processing, is probably mediated *in vivo* by Art complexed to DNA-PKcs. Indeed, it was recently shown *in vitro* that whereas free Art is an exonuclease, it becomes an endonuclease, endowed with hairpin opening activity once bound to - and activated by - DNA-PKcs (8). Furthermore, hairpin-sealed CEs accumulate in Art-deficient thymocytes, similar to the situation found in SCID mice (9). This opening is imprecise and can generate short inverted repeats of a few bases, the so-called P nucleotides. Bases can then be removed from free DNA ends. It is not known at the present time whereas this loss is mediated by Artemis, either free or bound to DNA-PKcs, or if it is mediated by a yet un-identified exonuclease. Finally, the TdT can add extra un-templated bases (N nucleotides) on the free DNA extremities (10, 11). The resulting coding joints (CJs) are highly heterogeneous (12). This variability is the basis of the enormous diversity observed in Ig and TCR repertoires.

In sharp contrast, signal ends (SEs) are generally held to be ligated together by NHEJ factors without any processing/modification, so that signal joints (SJs) are formed by a perfect head-to-head fusion of the heptamers of the rearranged genes RSSs (1, 2, 13). However, processed/modified SJs

can be found in wild type (wt) mice following *TCR* (14, 15) or *IgH* (16) gene rearrangement. In particular, we previously showed that a up to 25% of the signal joints created during the rearrangement of *TCRB* and *TCRD* genes in murine thymocytes do exhibit junctional diversity. This diversity resulted only from N nucleotide insertions for the *TCRB* genes, and from N additions and deletions for the *TCRD* genes, suggesting that the pattern of SJ modifications varies according to the nature of the TCR locus considered (15). Later studies suggested that even within the *TCRB* locus, SJ modification may dependent on the identity of the genes/RSS targeted for recombination (17, 18). The *TCRAD* locus is unique in that it encompasses the genes coding for the TCR δ and the TCR α chains, expressed by $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ thymocytes, respectively (19). TCR δ chain *DD*, *DJ* and *DC* genes are embedded in between the *ADV* and *AJ* genes coding for the TCR α chain. As a result of this organization, in murine thymocytes, several *ADV* gene families like *ADV2* can rearrange either with *DD/DJ* or with *AJ* genes, and therefore are used to encode either TCR δ or TCR α chains in individual T cells, respectively (20). *ADV/AJ* recombination excises the *TCRD* genes from the chromosome and results, after SJ formation, in the creation of a T cell receptor excision circle (TREC) carrying these genes. *TCRD* genes can also be “inactivated” by recombination of the δ Rec-1 element with an *AJ* gene. The δ Rec-1 element consists only of a functional RSS without any associated coding region (21). In the human thymus, rearrangement of this element with the *AJ61* pseudogene takes place at a high frequency in developing lymphocytes committed to the $\alpha\beta$ T cell lineage. In the murine thymus, the level of δ Rec-1/*AJ61* rearrangement in developing thymocyte is not as elevated as in human, a possible consequence of the combined existence of several yet undefined *AJ* gene acceptors on the one hand and two 2 other δ Rec elements on the other hand (22). In both human and mice peripheral blood lymphocytes, the level of δ Rec-1/*AJ61* SJ borne on TRECs is taken as a measure of $\alpha\beta$ T lymphocyte neogenesis and thymic output (23).

In this paper, we investigated the structure of SJs generated during V(D)J recombination at the *TCRAD* locus. Availing of the property of the murine *ADV2* gene family to rearrange with both *DD* and *AJ* genes (20), we first compared SJ generated during rearrangement of *TCRD* and *TCRA* genes. Next, we analyzed the combinatorial and junctional diversity of SJs generated during the recombination of the δ Rec-1 element in human and murine thymocytes. Our findings show that, like for *TCRB*, *TCRD* (15, 17) and *TCRG* (14) genes, rearrangement of *TCRA* genes generates diverse SJs, suggesting that this phenomenon is an intrinsic feature of V(D)J recombination in un-manipulated thymocytes.

Results.

ADV/AJ signal joints do exhibit TdT-based junctional diversity.

RSSs consist in a conserved heptamer separated from a semi conserved nonamer by 12 or 23 bases. The heptamer's first 3 bases show a very high degree of conservation, so that the vast majority of RSSs begin by a CAC triplet (4, 5). Consequently, the ligation of two SEs by NHEJ to create a SJ generates a site (CACGTG) for the ApaL1 restriction enzyme. This feature was used to probe the structure of SJs produced during *TCR ADV/AJ* gene rearrangement in un-manipulated total thymocytes. SJs resulting from the recombination of *ADV2* and *ADV8* genes with *AJ61*, *AJ58*, *AJ57* and *AJ56* were amplified from C57BL/6 thymocyte DNA. Un-digested and ApaL1-digested PCR products were then migrated onto an agarose gel and revealed after blotting by hybridization to radiolabelled AJ-specific probes. For each *ADV-AJ* combination tested, a significant fraction of the PCR products was resistant to ApaL1 digestion (Figure 1). This resistance indicates that some of the signal joints are modified and do not simply consist of abutted RSSs. We investigated the potential involvement of the TdT in the generation of ApaL1-resistant SJs (ApaL1-R SJs) by performing the same experiments on DNA from TdT-deficient thymocytes. Strikingly, in absence of TdT expression, ApaL1-R SJs almost completely disappear, for all the combinations (Figure 1). Similar results were obtained when we analyzed SJs produced after rearrangement of *ADV1*, *ADV6* and *ADV20* with the same set of *AJ* genes (data not shown). Therefore, SJ modification takes place during the rearrangement of at least 5 out of 21 *ADV* gene families. These results show that i) *ADV-AJ* SJs do exhibit junctional diversity, and ii) this diversity results almost totally from N nucleotides addition by the TdT.

Quantification and structure of modified signal joints.

In order to accurately determine the percentage of modified junctions, *ADV2/AJ* SJs were amplified from wild type (wt) thymocyte DNA and cloned, so that each SJ can be analyzed individually for modification by ApaL1 digestion of the corresponding recombinant plasmids. As shown in Table 1, the frequency of ApaL1-R SJs ranges from 9.7% for *ADV2/AJ58* to 39.1% for *ADV2/AJ61*, with an average of 33.6%. Thus, a significant fraction of *ADV2/AJ* SJs are modified, even though the frequency of modification seems to vary according to the *AJ* gene rearranged. The majority of these ApaL1-R SJs were sequenced, to precisely identify the nature of the modifications (Figure 2). These modifications consisted essentially of N nucleotide additions. Junctions were found to contain between 1 and 7 un-templated nucleotides, with an average of 2.8 per sequence. These N additions are mainly G and C nucleotides, which together represent more than 70% of the added bases, a bias

typical of TdT activity (24). It should be pointed out that the majority of the ADV2/AJ ApaL1-R SJ sequenced were unique (only two sequences were found twice), indicating a diverse repertoire of modified SJs.

Importantly, one ADV2/AJ57 SJ in which 4 N nucleotides were inserted also exhibits deletion of 3 bases from the ADV2 heptamer, suggesting that nucleotide loss from RSS ends can contribute to SJ diversity. This observation prompted us to investigate SJ structure in absence of TdT expression. ADV2/AJ56 SJs amplified from TdT-deficient mice were cloned and the resulting recombinant plasmids analyzed. The frequency of ApaL1-R plasmids was found to be 2.7% (2 out of 74). In one of these sequences, nucleotides have been lost from both ADV2 and AJ56 SEs (1 and 3 nt, respectively). In the other one, while ADV2 SE is complete, 4 bases have been deleted from AJ56 heptamer. This junction also contains one un-templated nucleotide (Figure 2). Such addition of un-templated nucleotide during V(D)J recombination in absence of TdT expression have been documented in mice (10, 15) and in human cell lines (25). These results indicate that base loss from RSS ends is a rare occurrence, and most of the modifications observed in TCRA SJs result from N nucleotide additions.

TCRD signal joints are modified by N nucleotide additions and exonucleolytic activity.

We previously showed that *TCRD* gene rearrangement generates signal joints modified by both N nucleotide addition and base loss (15). These data were obtained after analysis of *DV105* rearrangement to *DD2*. However, *DV105* rearranges by inversion (19) and SJ formation is therefore crucial for cell survival to maintain chromosomal integrity. It is formally possible that the presence of deletions from *DV105* and *DD2* RSSs reflects a more stringent association of these SEs with the V(D)J recombinase complex, including its exonucleolytic activity, to ensure proper ligation. Thus, to determine if base loss from SEs is a general feature of *TCRD* gene rearrangement or if it represents a peculiarity of rearrangement by inversion, we analyzed the structure of SJs produced during *DV102* to *DD2* rearrangement, which occurs by deletion.

ApaL1 digestion of recombinant plasmids obtained after DV102/DD2 SJs amplification and cloning from C57BL/6 thymocytes DNA revealed the presence of 34% of ApaL1-R signal joints (Table 3). More importantly, sequencing analysis clearly showed that 4 of these modified signal joints (out of 17 different junctions) have lost nucleotides from DV102 and/or DD2 ends (Figure 3). Nucleotide loss from SEs before they are ligated is therefore not dependent on whether *TCRD* genes rearrange by deletion or inversion.

We next performed the same analysis on ADV2/DD2 SJs amplified from C57BL/6 thymocyte DNA. The proportion of ApaL1-R recombinant plasmids was found to be 44.7% (Table 3). Sequencing

analysis yielded 21 different modified junctions. In 5 of these, the modifications consisted of both N nucleotide addition and base loss from the SEs (Figure 3). This proportion is similar to that found in DV102/DD2 SJs. However, it is statistically different ($p=0.01$ by a Mann-Whitney test) from that of deletions found in ApaL1-R ADV2/AJ SJs (1 deletion out of 34 modified signal joints in wt thymocytes), indicating that more deletions are introduced in SJs produced during *TCRD* compared to *TCRA* gene rearrangement, even when the same *ADV* gene family is used in both types of rearrangements.

Rearrangement of the δ Rec-1 element exhibits both combinatorial and junctional diversity

The expression of rearranged *TCR* genes is crucial for thymocyte survival. Thymocytes with unproductive *TCR* gene rearrangements, unable to express a functional TCR, or with a TCR of unwanted specificity are eliminated. Even though SJs are only by-products of *TCR* gene recombination and do not by themselves encode any selectable product, SJ repertoire may possibly be shaped by the selective forces operating via *TCR* gene expression on developing thymocytes. Hence, to have access to a truly unselected SJ repertoire, we next focused our attention on the structure of SJ produced by the recombination of the δ Rec-1 element: as the δ Rec-1 element is only a RSS without any associated coding sequence, δ Rec-1/AJ rearrangements are not subjected to any kind of selective pressure.

Murine thymocyte DNA was amplified with oligonucleotide primers designed to detect SJs resulting from the recombination of δ Rec-1 with *AJ61*, *AJ58*, *AJ57* and *AJ56*. All these SJs were easily detected, as shown in fig 4. In addition, we could also detect rearrangement of δ Rec-1 with *AJ* genes as distant as *AJ18* (data not shown). These findings demonstrate that the murine δ Rec-1 element does exhibit combinatorial diversity. As the RSS of the murine δ Rec-1 contains an ApaL1 site, we could not test the junctional diversity of these SJs by restriction of PCR products. Therefore, δ Rec-1/AJ61 PCR products were directly cloned and individual SJs sequenced without a priori knowledge of their status. Out of 53 SJ analyzed, 11 (31.42%) were modified (Figure 5). They all contain N nucleotides, from 2 to 12 bases per sequence, with an average of 4.4 per sequence. In addition, 3 bases have been lost from the δ Rec-1 SE in one of the SJ. Again, the lack of recurring sequence(s) illustrates the diversity of the murine δ Rec-1 SJ repertoire. These results show that recombination of the murine δ Rec-1 element in un-manipulated wt thymocyte generates a diverse repertoire of SJs that exhibits both combinatorial and junctional diversity.

We next amplified from human thymocyte DNA SJs produced by the recombination of δ Rec-1 with *AJ61*, *AJ58*, *AJ57* and *AJ56*, and digested the resulting PCR products with ApaL1. As shown in fig 6, a large fraction of the PCR products was resistant to ApaL1 cleavage, revealing the existence, for all the combinations tested, of modified SJs. To determine the nature of the modification(s), the ApaL1-R PCR products were gel purified and cloned; randomly selected colonies were sequenced (Figure 7). The presence of un-templated N nucleotides was evident in all the SJs analyzed. On average, 5.45 nucleotides were added per sequence, ranging from 1 to 11. In four cases (about 16%) bases have been lost from one of the SE. These deletions range from one to 13 bases. Once again, only one sequence was found twice, showing the diversity of the modified SJ repertoire. Thus in human as in murine thymocytes, δ Rec-1/AJ SJs do exhibit junctional diversity.

Discussion.

The enormous degree of junctional diversity observed in rearranged *TCR* coding genes is a hallmark of V(D)J recombination in developing T lymphocytes. It is generally thought that the reciprocal SJs produced at the same time and in the same cells by the same molecular machinery are devoid of any kind of junctional variability and consists of SEs ligated together without any base loss or addition (1, 2, 13). The data presented in this paper challenge this view and demonstrate that SJ modification is a widespread phenomenon in developing un-manipulated murine and human thymocytes. The structure of SJs resulting from *TCRA* and *TCRD* gene rearrangement in mice on the one hand, and from recombination of the δ Rec-1 element with various *AJ* genes in human and mice on the other hand was analyzed. We found that each type of recombination generated a diverse repertoire of SJs. The junctional diversity resulted from N nucleotide additions by the TdT and, in some cases, exonucleolytic nibbling of SEs.

Diversity in CJs results from a combination of three factors: the position of opening of the hairpin sealed coding end, which generates P nucleotides, exonucleolytic nibbling of opened coding ends, and finally polymerization of un-templated N nucleotides by the TdT on processed coding ends before they are assembled by NHEJ. Two of these three types of modifications, base loss and N nucleotide addition, were also found in SJs. We did not find any evidence of P nucleotide insertions in modified SJs, in agreement with the blunt-ended nature of RAGs-generated SEs (6, 26), or of imprecise cutting at the gene/RSS border, which would have resulted in the inclusion of a few coded bases in the SJs (see below). The activity of the TdT on SEs is amply demonstrated, both by the strong reduction of ApaL1-R SJs in TdT-deficient mice and by the sequencing of ApaL1-R SJs amplified from wt thymocytes, which allowed un-ambiguously to identify un-templated nucleotides in these junctions. Therefore, like CEs, SEs are a substrate for the TdT. *In vitro*, following RAGs-induced cleavage, SEs have been found to remain associated with RAG-1, RAG-2, the Ku complex and DNA-PKcs in a post-synaptic complex (27). In addition to these proteins, ATM and p53 were also found to be associated with SEs, in cell lines and in murine thymocytes (28). It was initially hypothesized that such DNA/proteins interactions could protect SEs from the activity of nucleases or polymerases (27), thus explaining the un-modified nature of SJs. However, the TdT interacts with the Ku proteins and they co-localize at the site of DNA DSBs indicating that Ku may recruit the TdT on DNA ends (29). Furthermore, Ku86 expression was found to be required for N nucleotide polymerization during rearrangement of artificial recombination substrates in rodent cell lines transfected with a TdT expression vector (30). Our data showing the presence of N nucleotides in SJs produced during *TCR* gene rearrangement in un-manipulated wt thymocytes, strongly suggest

that *in vivo*, the TdT is probably recruited on both CEs and SEs, where it catalyzes the polymerization of un-templated nucleotides.

The proportion of SJs containing N nucleotides is on average 33% and 39.2% for *TCRA* and *TCRD* gene rearrangement, respectively, indicating that a sizable fraction of these SJs, but not all of them, are modified through TdT activity. Modified TCR SJs in murine thymocytes contain on average around 3 N nucleotides per junction, i.e. a number similar to that found in TCR CJs (12, 31). This last observation suggests that once recruited, the TdT is as efficient on SEs as on CEs. It should be noted that in adult mice, not all TCR CJs include N nucleotide additions. For example, in a previous analysis of *ADV2* gene rearrangement in Balb/c thymocytes (20), only 86.7% (13 out of 15) of the sequenced rearranged *TCRA* transcripts were found to contain N nucleotides at the *ADV/AJ* junction. In a larger collection of rearranged *TCRB* transcripts from C57BL/6 thymocytes, this proportion is of 59% and 70% for the DJ and VD coding joints, respectively (31). Therefore, the difference between CJs and SJs does not reside in the presence or the absence of N nucleotide insertions but rather in their frequency. The sequence of the recombining genes seems to influence the extent of CEs processing during V(D)J recombination (32, 33). In this study, the frequency of modified *ADV2/AJ* SJs ranges from 9.7% to 39.1% according to *AJ* gene used. During *TCRB* gene rearrangement, the level of SJ modification was also found to depend on the *BV* gene rearranged (17). Together, these findings suggest that during V(D)J recombination in wt thymocytes, like for CEs, SEs processing, and therefore SJ modification, depends on the sequence of the rearranged genes, including probably their RSSs.

More surprisingly, we also found deletions in SJs resulting from *TCRD* gene rearrangement. This event is clearly less frequent than N additions. In two of the junctions, nucleotides have been removed from both coding ends. It is theoretically possible that these loss result from an imprecise cleavage at the gene/RSS border by the RAGs proteins. However, imprecise cutting would also generate SJs in which a few *V* and/or *D* bases are included, and none are observed. Therefore, base loss from SEs during *TCRD* gene rearrangement is most likely due to the action of an enzymatic activity during SE processing, before they are joined by NHEJ proteins. At the present time, the precise nature of the mechanism responsible for CEs deletions has not been identified. It may be possible that the DNA-PKcs/Art complex, which possesses an endonucleolytic activity (8), opens the hairpin-sealed CEs in more than one place on opposite strands, thereby cleaving off the tip of the hairpin. DNA-PKcs have been found associated with SEs in a post synaptic complex (28), but it remains to be determined whether a functional DNA-PKcs/Art complex also exists at that location. Another possibility would be that free Art, which *in vitro* is an exonuclease (8) acts on SEs after dissociation from DNA-PKcs. Among the other components of the V(D)J recombinase components,

the long isoform of the TdT (TdTL) have been shown *in vitro* and in transfected cell lines to have an exonuclease activity that counters the polymerase activity of the TdT short isoform (34). SEs deletions are however found in TdT-deficient mice (15, and this study), and the TdTL cannot therefore be responsible for all the deletions found in TCRD SJs. The last possibility is that a yet unidentified “true” exo- or endonuclease participates in CEs and/or SEs processing and removes a limited number of nucleotides from the ends to be joined. The recent discovery of an additional factor is required for both NHEJ and gene rearrangement in humans shows that all the actors of these pathways have not yet been characterized (35).

In any case, and irrespective of the exact molecular actors of SE processing, our results show that the pattern of the modifications (N additions only vs N additions and occasional deletions) differs according to the identity of the genes that are rearranged. As already mentioned, it was previously found that the level of N nucleotides additions in SJs depends on the nature of the *BV* gene rearranged (17). Gene-specific SJ modifications were also observed in a study addressing the role of the non-core portions of the RAG proteins in the fidelity of V(D)J recombination (18). We now provide evidence that, in murine thymocytes, base removal in SJ is more frequent during *TCRD* than *TCRA* gene rearrangement. It is possible that these results represent just a new occurrence of gene specific SJ modification (17, 18). However, it is also possible that the enzymatic activities participating in SE processing during *TCRA* and *TCRD* gene rearrangement are not identical. These two types of recombination events are under the control of distinct cis-acting elements (enhancer δ vs enhancer α), that may participate in the recruitment and activation of DNA repair proteins required to process and resolve free SEs (36). Additional factors may be recruited, that either protect *TCRA* SEs from nibbling or do remove bases from *TCRD* SEs. It may also be that this putative additional factors does not *per se* operate directly on SEs, but rather activates (or on the opposite prevents the activation of) the nuclease responsible for SE deletions. Another possible explanation for this difference resides in the fact that the *DD2* gene is flanked on both sides by RSSs. During *TCRB* gene recombination there is a clear temporal dissociation of *D* to *J* and then *V* to *DJ* rearrangements. In contrast, at the *TCRD* locus, *V* to *D*, *D* to *D* and *D* to *J* rearrangements seem to proceed concurrently. Both types of intermediates are found in hybridomas produced from fetal thymocytes (37), suggesting that the RSSs bordering the *TCRD D* segments are active at the same time, if not in the same cell. The architecture of the recombination complex assembled on any one of these RSSs may therefore be influenced by the close proximity of another functional docking site for the RAGs proteins, possibly resulting in different composition and/or activity.

Finally, in addition to their theoretical implications for the mechanism of V(D)J recombination, our results have practical implications regarding the use of TRECs as a mean to assess thymic function

and de novo thymopoiesis. First, several methods have been developed that are based on the quantitative measurement by real time PCR of the level of δ Rec-1/AJ61 SJ in PBLs. In some, the hybridization probe either spans or is located immediately adjacent to the junction (38-40) and a sizable, potentially variable, fraction of the TRECs will therefore not be detected. As we do not know yet the molecular mechanisms responsible for SJ modification, one should be aware of this caveat when using such a protocol to compare lymphocyte recovery in treated patients versus untreated donors. More importantly, our findings also suggest that it is now possible to use not only SJ levels, but also SJ length polymorphism to monitor the recovery of the immune system after a graft or after anti viral therapy. Indeed, whereas the level of a given TREC will be indicative of the number of T lymphocytes produced, the diversity of these TRECs will depend not on the number but on the diversity of the newly generated T lymphocytes. It will therefore be possible to determine, by spectratyping experiments similar to those performed on rearranged *TCR* genes (41), whether the emerging T lymphocyte repertoire is mono-, oligo- or poly-clonal.

In conclusion, we show in this paper that a large fraction of SJs generated during *TCRA* and *TCRD* gene rearrangement are modified through N additions and, in the case of *TCRD*, deletions. Together with ours (15) and others (14, 16) previous findings, these results strongly suggest that SJ modification is an intrinsic feature of V(D)J recombination. That this feature have not been recognized earlier probably stems from the fact that the first studies devoted to the characterization of SJ structure were conducted in pre-B cells and concerned SJs produced during rearrangement of IgL chain genes (13, 42, 43). The *TdT* gene is not expressed in these cells at that time (44) and consequently, even IgL coding joints exhibit a paucity in N nucleotide additions (45). Until now, modified SJs were considered to be the aberrant products of an impaired V(D)J recombination reaction. A high level of modified signal joints have been for example described in transgenic mice expressing core RAG-1 or core RAG-2 (18, 46). In these studies, the modifications consisted not only in N nucleotide addition and base loss, but also in the retention of coding flank bases. Our findings in wt mice expressing full length RAG proteins demonstrate that coding flank retention is the only “aberration” characteristic of core RAG proteins. Therefore the non-core portions of RAG-1 and/or RAG-2 are truly essential only for the precision of the nicking step of V(D)J recombination.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 mice were bred in the animal facility of the Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble. Mice were sacrificed by CO₂ inhalation and their thymus removed at 4-8 weeks of age, in accordance with the Atomic Energy Commission Animal Care and Use Committee.

DNA preparation

Thymocyte DNA was prepared from 10⁷ cells using the Nucleospin tissue Kit (Macherey –Nagel), according to the manufacturer's instructions. Human thymocytes were obtained from Dr J. London (Denis Diderot University, Paris). DNA from TdT^{0/0} thymocytes (10) is a gift from Dr N. Fazilleau (Institut Pasteur, Paris).

Signal Joints amplification and digestion

Thymocyte DNA (100 ng) was amplified with relevant primers (10 pmoles) using AmpliTaq Gold PCR Mix as follows: 94°C, 10 m, then 35 cycles consisting of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C, followed by a 10 m incubation at 72°C. PCR reactions were carried out on a GenAmp PCR system 9600 apparatus (Perkin-Elmer) in a final volume of 25 µL. Primer sequences are shown in Table 3. Following amplification, 5 to 10 µL of the PCR products were digested with 5 U of ApaL1 (Amersham Pharmacia Biotech) for 3 hrs at 37°C in the supplied buffer. Un-digested controls were incubated similarly, but without ApaL1. Un-digested and digested products were resolved side by side on 2% agarose gel, transferred onto N-Hybond+ membrane (Amersham Biosciences) and hybridized with a mix of radio-labeled oligonucleotide probes (5'AJ47p; AJ57RSSp; AJ58RSSp; TREC_AJ61p) specific for the AJ moiety of the amplified signal joints. Hybridized blots analysis was performed on a Personnal FX Imager (Biorad), using the Quantity One software.

Signal Joints Cloning and Sequencing

PCR products were gel purified, cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) according to the manufacturer's instructions and transformed into competent bacteria. After plating, positive colonies were identified by hybridization with AJ-specific oligonucleotide probes. Plasmids were prepared from SJ-containing colonies either with the Wizard miniprep kit (Promega) or the Montage Plasmid Miniprep 96 system (Millipore Corporation). Individual SJ-containing plasmids were then digested with ApaL1. The pGEM-T Easy plasmid contains 2 sites for this enzyme. If the recombinant

plasmid contains an un-modified signal joint, formed by the perfect fusion of the RSSs, an additional ApaL1 site is introduced and the digestion yields 3 bands after migration on an agarose gel. If the recombinant plasmid contains a modified signal joint, this additional site is not introduced and the digestion yields only 2 bands. Plasmids showing unexpected patterns, either in the number or the size of the DNA fragments were excluded from further analysis. Plasmids containing a modified signal joints were sequenced (Genome Express), to identify the nature of the modifications. Identical modified signal joints obtained from a same sample were counted only once, since we cannot determine if these multiple occurrences results from independent events or from over-amplification of a single signal joint.

Acknowledgments

This work was supported by institutional grants from the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” and the « Commissariat à l’Energie Atomique ». CT was partially supported by a fellowship from the « Association pour la Recherche contre le Cancer ». The authors are grateful to Drs N. Fazilleau and J. London for their gifts of reagents. The authors also want to warmly thank Léa Roger et Aline Chuilon for their technical help during the analysis of murine and human δ Rec-1 element recombination. The authors have no conflicting financial interests.

References

1. Jung, D., and F.W. Alt. 2004. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116:299-311.
2. Rooney, S., J. Chaudhuri, and F.W. Alt. 2004. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev* 200:115-131.
3. Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581.
4. Akira, S., K. Okazaki, and H. Sakano. 1987. Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* 238:1134-1138.
5. Hesse, J.E., M.R. Lieber, K. Mizuuchi, and M. Gellert. 1989. V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* 3:1053-1061.
6. Schlissel, M., A. Constantinescu, T. Morrow, M. Baxter, and A. Peng. 1993. Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev* 7:2520-2532.
7. McBlane, J.F., D.C. van Gent, D.A. Ramsden, C. Romeo, C.A. Cuomo, M. Gellert, and M.A. Oettinger. 1995. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83:387-395.
8. Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz, and M.R. Lieber. 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781-794.
9. Rooney, S., J. Sekiguchi, C. Zhu, H.L. Cheng, J. Manis, S. Whitlow, J. DeVido, D. Foy, J. Chaudhuri, D. Lombard, and F.W. Alt. 2002. Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice. *Mol Cell* 10:1379-1390.
10. Gilfillan, S., A. Dierich, M. Lemeur, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261:1175-1178.
11. Komori, T., A. Okada, V. Stewart, and F.W. Alt. 1993. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261:1171-1175.
12. Candéias, S., C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1991. The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *J.Exp.Med.* 174:989-1000.
13. Lewis, S., A. Gifford, and D. Baltimore. 1985. DNA elements are asymmetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes. *Science* 228:677-685.
14. Iwasato, T., and H. Yamagishi. 1992. Novel excision products of T cell receptor gamma gene rearrangements and developmental stage specificity implied by the frequency of nucleotide insertions at signal joints. *Eur J Immunol* 22:101-106.
15. Candéias, S., K. Muegge, and S.K. Durum. 1996. Junctional diversity in signal joints from T cell receptor beta and delta loci via terminal deoxynucleotidyl transferase and exonucleolytic activity. *J.Exp.Med.* 184:1919-1926.
16. Shimizu, T., and H. Yamagishi. 1992. Biased reading frames of pre-existing DH--JH coding joints and preferential nucleotide insertions at VH--DJH signal joints of excision products of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Embo J* 11:4869-4875.
17. Kanari, Y., R. Nakagawa, H. Arakawa, and H. Yamagishi. 1998. Variable gene segment-specific N-insertions at the signal joint of T-cell receptor Vbeta-Dbeta recombinations. *Immunol Lett* 61:151-155.
18. Talukder, S.R., D.D. Dudley, F.W. Alt, Y. Takahama, and Y. Akamatsu. 2004. Increased frequency of aberrant V(D)J recombination products in core RAG-expressing mice. *Nucleic Acids Res* 32:4539-4549.
19. Krangel, M.S., C. Hernandez-Munain, P. Lauzurica, M. McMurry, J.L. Roberts, and X.P. Zhong. 1998. Developmental regulation of V(D)J recombination at the TCR alpha/delta locus. *Immunol.Rev.* 165:131-47:131-147.

20. Jouvin-Marche, E., C. Aude-Garcia, S. Candéias, E. Borel, S. Hachemi-Rachedi, H. Gahery-Segard, P.A. Cazenave, and P.N. Marche. 1998. Differential chronology of TCRADV2 gene use by alpha and delta chains of the mouse TCR. *Eur.J.Immunol.* 28:818-827.
21. de Villartay, J.P., R.D. Hockett, D. Coran, S.J. Korsmeyer, and D.I. Cohen. 1988. Deletion of the human T-cell receptor delta-gene by a site-specific recombination. *Nature* 335:170-174.
22. Pido-Lopez, J., N. Imami, D. Andrew, and R. Aspinall. 2002. Molecular quantitation of thymic output in mice and the effect of IL-7. *Eur J Immunol* 32:2827-2836.
23. Hazenberg, M.D., M.C. Verschuren, D. Hamann, F. Miedema, and J.J. van Dongen. 2001. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med* 79:631-640.
24. Alt, F.W., and D. Baltimore. 1982. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4118-4122.
25. Gauss, G.H., and M.R. Lieber. 1996. Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 16:258-269.
26. Roth, D.B., C. Zhu, and M. Gellert. 1993. Characterization of broken DNA molecules associated with V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10788-10792.
27. Agrawal, A., and D.G. Schatz. 1997. RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination. *Cell* 89:43-53.
28. Perkins, E.J., A. Nair, D.O. Cowley, T. Van Dyke, Y. Chang, and D.A. Ramsden. 2002. Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev* 16:159-164.
29. Mahajan, K.N., L. Gangi-Peterson, D.H. Sorscher, J. Wang, K.N. Gathy, N.P. Mahajan, W.H. Reeves, and B.S. Mitchell. 1999. Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13926-13931.
30. Purugganan, M.M., S. Shah, J.F. Kearney, and D.B. Roth. 2001. Ku80 is required for addition of N nucleotides to V(D)J recombination junctions by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res* 29:1638-1646.
31. Bogue, M., S. Candéias, C. Benoist, and D. Mathis. 1991. A special repertoire of alpha:beta T cells in neonatal mice. *EMBO J.* 10:3647-3654.
32. Nadel, B., S. Tehranchi, and A.J. Feeney. 1995. Coding end processing is similar throughout ontogeny. *J Immunol* 154:6430-6436.
33. Ezekiel, U.R., T. Sun, G. Bozek, and U. Storb. 1997. The composition of coding joints formed in V(D)J recombination is strongly affected by the nucleotide sequence of the coding ends and their relationship to the recombination signal sequences. *Mol Cell Biol* 17:4191-4197.
34. Thai, T.H., M.M. Purugganan, D.B. Roth, and J.F. Kearney. 2002. Distinct and opposite diversifying activities of terminal transferase splice variants. *Nat Immunol* 3:457-462.
35. Dai, Y., B. Kysela, L.A. Hanakahi, K. Manolis, E. Riballo, M. Stumm, T.O. Harville, S.C. West, M.A. Oettinger, and P.A. Jeggo. 2003. Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2462-2467.
36. Hempel, W.M., P. Stanhope-Baker, N. Mathieu, F. Huang, M.S. Schlissel, and P. Ferrier. 1998. Enhancer control of V(D)J recombination at the TCRbeta locus: differential effects on DNA cleavage and joining. *Genes Dev.* 12:2305-2317.
37. Chien, Y.H., M. Iwashima, D.A. Wettstein, K.B. Kaplan, J.F. Elliott, W. Born, and M.M. Davis. 1987. T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 330:722-727.
38. Hazenberg, M.D., S.A. Otto, J.W. Cohen Stuart, M.C. Verschuren, J.C. Borleffs, C.A. Boucher, R.A. Coutinho, J.M. Lange, T.F. Rinke de Wit, A. Tsegaye, J.J. van Dongen, D. Hamann, R.J. de Boer, and F. Miedema. 2000. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med* 6:1036-1042.

39. Hochberg, E.P., A.C. Chillemi, C.J. Wu, D. Neuberg, C. Canning, K. Hartman, E.P. Alyea, R.J. Soiffer, S.A. Kalams, and J. Ritz. 2001. Quantitation of T-cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults. *Blood* 98:1116-1121.
40. Schonland, S.O., J.K. Zimmer, C.M. Lopez-Benitez, T. Widmann, K.D. Ramin, J.J. Goronzy, and C.M. Weyand. 2003. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood* 102:1428-1434.
41. Vigan, I., E. Jouvin-Marche, V. Leroy, M. Pernollet, S. Tongiani-Dashan, E. Borel, E. Delachanal, M. Colomb, J.P. Zarski, and P.N. Marche. 2003. T lymphocytes infiltrating the liver during chronic hepatitis C infection express a broad range of T-cell receptor beta chain diversity. *J Hepatol* 38:651-659.
42. Selsing, E., J. Voss, and U. Storb. 1984. Immunoglobulin gene 'remnant' DNA--implications for antibody gene recombination. *Nucleic Acids Res* 12:4229-4246.
43. Steinmetz, M., W. Altenburger, and H.G. Zachau. 1980. A rearranged DNA sequence possibly related to the translocation of immunoglobulin gene segments. *Nucleic Acids Res* 8:1709-1720.
44. Li, Y., K. Hayakawa, and R. Hardy. 1993. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J. Exp. Med.* 178:951-960.
45. Bentolila, L., G. Wu, F. Nourrit, M. Fanton d'Andon, F. Rougeon, and N. Doyen. 1997. Constitutive expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in transgenic mice is sufficient for N region diversity to occur at any Ig locus throughout B cell differentiation. *J Immunol* 158:715-723.
46. Li, Z., D.I. Dordai, J. Lee, and S. Desiderio. 1996. A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity* 5:575-589.

Figure Legends

Figure 1: ADV/AJ signal joints exhibit TdT-based junctional diversity. Signal joints resulting from ADV2 and ADV8 rearrangement with AJ61, AJ58, AJ57 and AJ56 were amplified from C57BL/6 (wt) and TdT-deficient (TdT) thymocyte DNA. PCR products were either un-digested (-) or digested (+) with ApaL1 before migration, transfer and hybridization with radio-labeled internal AJ probes.

Figure 2: ADV2/AJ signal joint sequences. Modified ADV2/AJ signal joints were amplified cloned and sequenced as described in Materials and Methods. In each section, the heptamer germ line sequences are indicated in bold above the line. Signal joints were amplified from 2 mice in each case. The column designated N encompasses un-templated nucleotides. Dashes indicate deleted nucleotides. In the last section, the sequences originating from C57BL/6 and TdT0/0 thymocytes are indicated. Sequences found several times in the same DNA sample but counted only once are indicated (2x). ^ and ^^ denote identical signal joints obtained from 2 different mice. * denotes two signal joints with identical N nucleotide insertion but in which different ADV2 genes were identified.

Figure 3: DV102/DD2 and ADV2/DD2 signal joint sequences. In each section, the heptamer germ line sequences are indicated in bold above the line. Signal joints were amplified from 2 mice in each case. The column designated N encompasses un-templated nucleotides. Dashes indicate deleted nucleotides. (-7) indicates that the 7 bases of the heptamer were deleted. The number of occurrences of a given sequence found several fold in a sample is indicated on the right column (nx).

Figure 4: The murine δ Rec-1 element rearranges with several AJ genes. Signal joints resulting from the rearrangement of the δ Rec-1 element with AJ61, AJ58, AJ57 and AJ56 were amplified from C57BL/6 thymocyte DNA and probed, after transfer, with a radio labeled δ Rec-1 probe.

Figure 5: Murine δ Rec-1/AJ61 signal joint sequences. Signal joints resulting from the rearrangement of δ Rec-1 and AJ 61 were amplified from murine thymocyte DNA. The PCR products were cloned and sequenced without a priory selection of modified signal joints. The heptamer germ line sequences are indicated in bold above the line. The column designated N encompasses un-templated nucleotides. Dashes indicate deleted nucleotides. Out of 35 SJ sequenced from two mice, 11 were found modified and 24 un-modified (24x).

Figure 6: A diverse repertoire of δ Rec-1 rearrangements in human thymocytes. Signal joints resulting from the recombination of the human δ Rec-1 element with AJ61, AJ58, AJ57 and AJ56 were amplified from thymocyte DNA samples prepared from two patients aged of 10 (A) and 6 (B) days, respectively. PCR products were either un-digested (-) or digested (+) with ApaL1 before migration, transfer and hybridization with radio-labeled internal δ Rec-1 probe.

Figure 7: Human δ Rec-1/AJ signal joint sequences. Modified δ Rec-1/AJ signal joints were amplified cloned and sequenced as described in Materials and Methods. In each section, the heptamer germ line sequences are indicated in bold above the line. Signal joints were amplified from the two samples used in figure 6. The column designated N encompasses un-templated nucleotides. Dashes indicate deleted nucleotides. (-13) indicates that 13 bases were deleted from AJ57 signal end. ^ denotes identical signal joints obtained in both patients.

Table 1: Analysis of signal joints resulting from TCRA gene rearrangement

	ApaL1-S (S)	ApaL1-R	ApaL1-R Sequenced	Unique Sequences (R*)	Frequency R*/(R*+S)	N/Seq	SJ with deletion
ADV2-AJ61	14	11	9	9	39.1%	3.1	1
ADV2-AJ58	28	4	4	3	9.7%	1.7	0
ADV2-AJ57	25	6	6	6	19.3%	2.5	0
ADV2-AJ56	35	18	17	16	31.4%	3.1	0
Total	67	39	36	34	33.6	2.6	1

Table 2: Analysis of signal joints resulting from TCRD gene rearrangement

	ApaL1-S (S)	ApaL1-R	ApaL1-R Sequenced	Unique Sequences (R*)	Frequency $R^*/(R^*+S)$	N/Seq	SJ with deletion
ADV2-DD2	26	28	25	21	44.7%	2.8	6
DV102-DD2	33	25	25	17	34%	3.1	4
Total	59	53	50	38	39.2	2.9	10

Table 3: Oligonucleotide primers used in this study

Name (specificity)	Sequence (5'→ 3')
hδRec-1RSS ^a	GAAAACACAGTGTGACATGGAGGGCTG
hδRec-1RSSp	AACTCGTGAGAACGGTGAATGAAG
hAJ61RSS	GGTGCCTCTGTCAACAAAGGTGATG
hAJ58RSS	TCATATCTCTGGACATATCTGTCAGG
hAJ57RSS	AGTAATCAGATTTGTTCTATAGGTCC
hAJ56RSS	GCTGGTTTTATCAGGGGGATTCTTGG
5'JATA47 (AJ56)	CAGTAGGGGATGGATGCTAACATGA
5'AJ47p (AJ56)	AGTCCACAGATCCTACCACTGCTG
AJ57RSS-L	TCCCTGGGAGACTCAC
AJ57RSSp	TCTGGCTCCTATCGGCTAGCAGAAG
AJ58RSS-L	GGATGGTATCGCTTATTCCT
AJ58RSSp	TCGCACAGTGGAGGAACTTCTAGTCCT
AJ59RSS	CTCAGCAGACCTCAGTCCATCACC
AJ59RSSp	ACAGGCACAATGAGTTGCCCTATCC
AJ60RSS	ATGACAGTCCAAGATGCTGCCTCC
AJ60RSSp	GACCTGGAGTGTGAGGGAAAAGTG
TREC_AJ61	TCTCTGAGGAACACGGAGTATC
TREC_AJ61p	GCTGACAGGGCAGGTTTTTGTAAG
TREC_DR (δRec-1)	TGTGTCCTCAGCCTTGATCCAT
TREC_DRp (δRec-1)	ACTTATTGCAGCTCCTGAGCAT

^a: All the human specific oligonucleotides begin by “h”

Figure 1

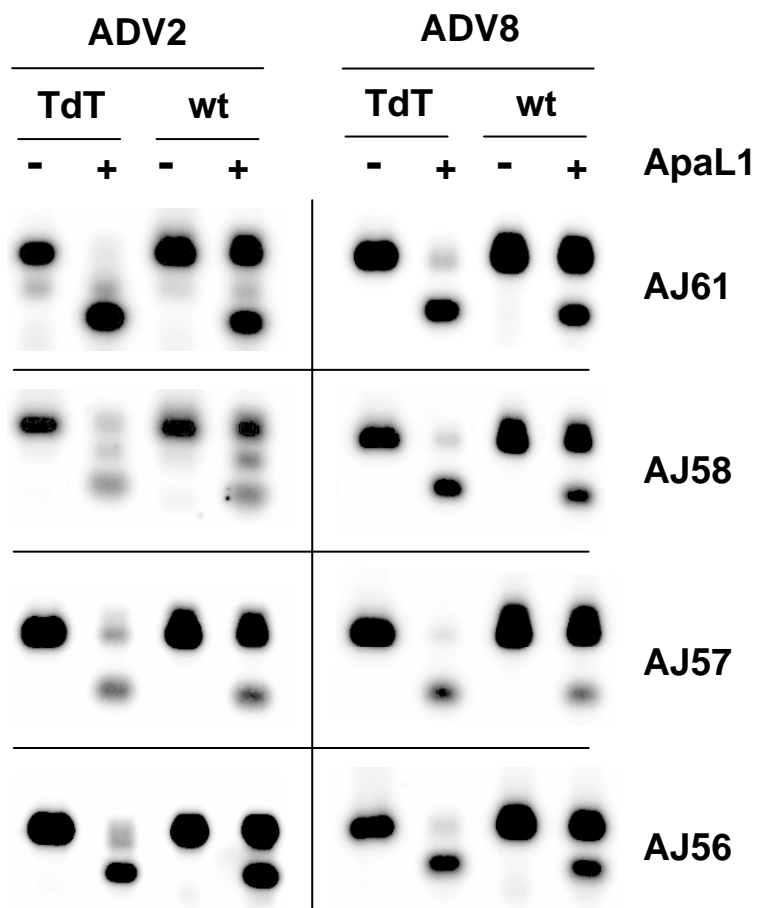


Figure 2

ADV2		AJ61
GTGACAC	N	GTGTCTT
GTGACAC	CCA	GTGTCTT
GTGACAC	CTC	GTGTCTT
GTGACAC	CCT	GTGTCTT
GTGACAC	GAG	GTGTCTT
GTGACAC	GG	GTGTCTT
GTGACAC	GGGGGA	GTGTCTT
GTGACAC	CTAGC	GTGTCTT
GTGACAC	CA	GTGTCTT
GTGACAC	C	GTGTCTT
ADV2		AJ58
GTGACAC	N	GTGACGT
GTGACAC	GG	GTGACGT
GTGACAC	CC	GTGACGN
GTGACAC	A	GTGACGT
ADV2		AJ57
GTGACAC	N	GTGTGGG
GTGA---	GGGA	GTGTGGG
GTGACAC	TG	GTGTGGG
GTGACAC	CC	GTGTGGG
GTGACAC	GGG	GTGTGGG
GTGACAC	CG	GTGTGGG
GTGACAC	AA	GTGTGGG
ADV2		AJ56
GTGACAC	N	GTGTTAC
C57BL/6		
GTGACAC	CTTCCTT	GTGTTAC
GTGACAC	CCCGGA	GTGTTAC
GTGACAC	TTCGG	GTGTTAC
GTGACAC	GCG	GTGTTAC
GTGACAC	AGT	GTGTTAC
GTGACAC	CCG	GTGTTAC
GTGACAC	CA	GTGTTAC^
GTGACAC*	GG	GTGTTAC
GTGACAC*	GG	GTGTTAC
GTGACAC	CC	GTGTTAC^^
GTGACAC	TA	GTGTTAC
GTGACAC	TG	GTGTTAC
GTGACAC	ACG	GTGTTAC
GTGACAC	GGA	GTGTTAT
GTGACAC	CC	GTGTTAC^^
GTGACAC	CA	GTGTTAC^
TdT ^{-/-}		
GTGACA-		---TTAC
GTGACAC	G	----TAC

Figure 3

DV102		DD2
GTGACAC	N	GTGCCAC
GTGACAC	GGGC	GTGCCAC
GTGACAC	GAGG	GTGCCAC 3x
GTGACAC	GGA	GTGCCAC
GTGACAC	TTG	GTGCCAC 2x
GTGACAC	CA	GTGCCAC 4x
GTGACAC	C	GTGCCAC 2x
GTGACAC		-----AC
GTGACAC	GGGGG	GTGCCAC
GTGACAC	TGNTG	GTGNCAC
GTGACAC	TTT	--GCCAC
GTGACAC	CA	GTGCCAC
GTGACAC	GA	GTGCCAC 2x
GTGACAC	GC	GTGCCAC
GTGAC--	GC	-TGCCAC
GTGACAC	CC	GTGCCAC
GTGACAC	AC	---CCAC

ADV2		DD2
GTGACAC	N	GTGCCAC
GTGACAC	CCCTAC	---CCAC
GTGACAC	CAA	GTGCCAC
GTGACAC	CCC	GTGCCAC
GTGACAC	AGA	GTGCCAC
GTGACAC	AG	GTGCCAC
GTGACAC	GC	GTGCCAC 2x
GTGACAC	GT	--GCCAC
GTGACAC	A	GTGCCAC
GTGA---	CCCCCAGG	GTGCCAC
G-----	GTCTTCCCCCT	----(-7)
GTGACAC	GCC	GTGCCAC
GTGACAC	CAA	GTGCCAC
GTGACAC	GCC	GTGCCAC
GTGACAC	GC	GTGCCAC
GTGACAC	GG	--GCCAC
GTGACAC	GC	GTGCCAC
GTGACAC	GG	GTGCCAC
GTGACAC	GG	--GCCAC
GTGACAC	AG	GTGCCAC 2x
GTGACAC	GA	GTGCCAC
GTGACAC	A	GTGCCAC 3x

Figure4

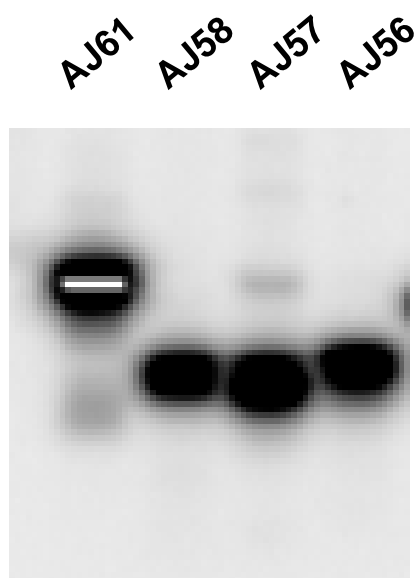


Figure 5

δRec-1		AJ61	
CACTGTG	N	CACAGAA	
CACTGTG		CACAGAA	24x
CACT---	AGTGACCCCCGT	CACAGAA	
CACTGTG	GGGACCA	CACAGAA	
CACTGTG	GGATCT	CACAGAA	
CACTGTG	CAGCC	CACAGAA	
CACTGTG	CCCCT	CACAGAA	
CACTGTG	CCC	CACAGAA	
CACTGTG	GG	CACAGAA	
CACTGTG	AT	CACAGAA	
CACTGTG	TC	CACAGAA	
CACTGTG	CC	CACAGAA	
CACTGTG	GC	CACAGAA	

Figure 6

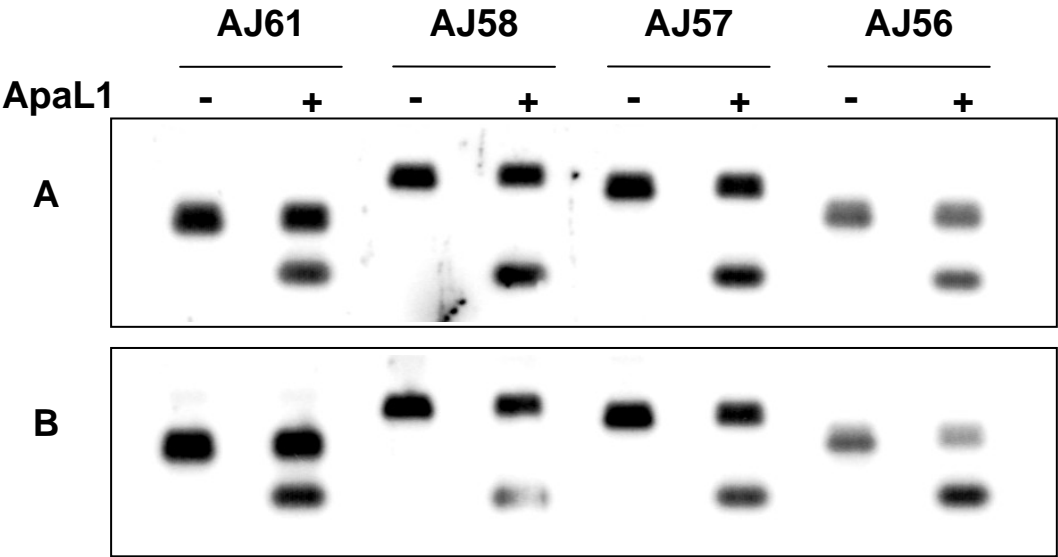


Figure 7

δRec-1		AJ61
CACCGTG	N	CACAGGA
CACCGT-	C	CACAGGA
CACCGTG	TC	CACAGGA
CACCGTG	AGGA	CACAGGA
CACCGTG	AGCCCCC	CACAGGA
CACCGT-	CCGGAGCCGCA	CACAGGA
CACCGTG	CCTTTAGACTT	CACAGGA
CACCGTG	GCTTA	CACAGGA
CACCGTG	AGGTCTTC	CACAGGA
δRec-1		AJ58
CACCGTG	N	CACTGTG
CACCGTG	TC	CACTGTG
CACCGTG	GGGCC	CACTGTG
CACCGTG	GTTAAT	CACTGTG
CACCGTG	CGCTC	CACTGTG
CACCGTG	GTTCAGCTTTA	CACTGTG
CACCGTG	ATTAAC	CACTGTG
δRec-1		AJ57
CACCGTG	N	CACCCCC
CACCGTG	CCC	CACCCCC^
CACCGTG	CCC	CACCCCC^
CACCGTG	GGGT	CACCCCC
CACCGTG	TACC	CACCCCC
CACCGTG	GGACCC	CACCCCC
δRec-1		AJ56
CACCGTG	N	CACAATG
CACCGTG	GG	-- (-13)
CACCGTG	TCAAAA	---AATG
CACCGTG	GAA	CACAATG
CACCGTG	GGCAAGTC	CACAATG
CACCGTG	AACTTTCT	CACAATG

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Implication des facteurs associés à la réparation par NHEJ et au maintien de la stabilité du génome dans la formation des jonctions signal.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Implication des facteurs associés à la réparation par NHEJ et au maintient de la stabilité du génome dans la formation des jonctions signal.

Nos résultats précédents montrent que les JS présentent un degré significatif de diversité jonctionnelle. De 9 à 30% des jonctions signal sont modifiées, selon l'identité des gènes réarrangés. Ces différences du taux de modification peuvent provenir de la séquence des gènes, incluant leur RSS, et/ou du locus auquel appartiennent ces gènes (TRCD vs TCRA). Dans le même temps Perkins et al ont montré par co-immunoprécipitation, que les protéines ATM et p53 sont trouvées associées aux extrémités signal dans les lymphocytes T (Perkins et al., 2002). Ces protéines sont probablement associées au complexe post synaptique comprenant RAG-1, RAG-2, DNA-PK-cs et la TdT. De plus, p53 est phosphorylée en Ser 15 ce qui suggère qu'elle est activée par ATM (Chao et al., 2000). La présence de ces protéines pourrait servir à instaurer un checkpoint dépendant de la résolution correcte des extrémités RSS (formation de la jonction signal) (Perkins et al., 2002). Ce checkpoint préviendrait la persistance d'extrémités libres d'ADN pouvant servir de substrat à la transposition médiée par les protéines RAG (Lee et al., 2002; Messier et al., 2003; Neiditch et al., 2002) ou provoquer l'apoptose de la cellule induite par les systèmes de maintien de l'intégrité du génome.

L'étendue des modifications et leur nature sont cependant fortement différentes entre les JS et les JC. Alors que la fréquence d'addition de nucléotides N au niveau des JC atteint les 75% et que quasiment toutes présentent les délétions, les JS formées lors du réarrangement des mêmes gènes sont nettement moins diversifiées.

Deux hypothèses peuvent être avancées.

1. La présence des protéines RAG qui restent fixées sur les RSS mais pas sur les extrémités codantes protègent les extrémités signal de l'action des exonucléases et de par leur encombrement stérique gênent l'action de la TdT (Agrawal and Schatz, 1997).

2. La résolution des extrémités signal est dissociée de la résolution des extrémités codantes et le complexe protéique diffère de par sa composition.

Si la dernière hypothèse est supportée par une durée de vie des extrémités signal supérieure à celle des extrémités codantes (Ramsden and Gellert, 1995) et par la présence d'ATM et p53 au niveau des extrémités signal, ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives.

Une participation d'ATM et p53 dans la formation des JS peut être envisagée. En effet ATM pourrait influencer directement sur la formation des JS en phosphorylant Artémis après son recrutement par DNA-PKcs (Chen et al., 2005; Zhang et al., 2004). Une fois phosphorylée et associée à DNA-PKcs Artémis perd son activité exonucléasique au profit d'une activité endonucléasique (Ma et al., 2002). Au niveau des extrémités codantes, la coupure de l'épingle à cheveux par Artémis est ciblée au niveau des nucléotides les plus proximaux. La coupure a en effet lieu en moyenne à 2 à 3 nucléotides de l'apex (Schlissel, 1998). Les extrémités signal (ES) étant protégée par RAG-1 et RAG-2, Artémis phosphorylée ne peut donc pas exercer son activité endonucléasique. ATM influencerait ainsi l'étendue des délétions provoquées par Artémis au niveau de la JS. Enfin ATM en recrutant et activant p53 et en formant un checkpoint pourrait signaler la cassure double brin et influencer sa résolution en recrutant et/ou activant des protéines de réparations absente au niveau des extrémités codantes. Aucun rôle pour ces protéines n'a été décrit dans la formation des jonctions codantes jusque là (Wang et al., 1997). Cependant la complexité des JC pourrait masquer leur rôle. Nous allons donc analyser les JS dont la structure est moins complexe dans les souris ATM^{-/-} (un don du Dr Nadel) et p53^{-/-}.

D'autre part, dans notre étude précédente, la grande majorité des modifications consistait en ajout de nucléotides N par la TdT. Il a été montré que la TdT est recrutée par une des protéines du complexe DNA-PK : Ku80 (Purugganan et al., 2001). Dans les souris Ku80^{-/-} des modifications de la fidélité de la JS ont été mise en évidence. Dans les souris SCID, l'efficacité de formation des JS est diminuée d'un facteur 10 environ. La résolution des extrémités signal est infidèle et les JS comme les JC présentent une fréquence élevée de modification par délétion (Blackwell et al., 1989; Schuler et al., 1986). L'étude de Bogue dans les mêmes souris est cependant contradictoire puisque le séquençage des JS de souris SCID ne fait pas apparaître d'augmentation significative de la fréquence des délétions (Bogue et al., 1997). Dans les souris DNA-PKcs^{-/-} (Gao et al., 1998) les JS sont affectées de la même manière que dans les souris SCID. Taccioli et al ont aussi généré une souris exprimant une protéine DNA-PKcs dépourvue de toute activité catalytique (Taccioli et al., 1998). Dans ces souris contrairement aux souris SCID ou DNA-PKcs^{-/-} le niveau de JS est

normal. Ces JS sont d'autre part moins modifiées que dans les souris SCID. Le rôle de l'activité kinase de DNA-PKcs dans la formation et la fidélité des JS reste donc peu clair et a souvent été exploré par digestion du produit d'amplification PCR de la JS. La détermination du ratio résistant/non résistant n'est cependant pas, dans nos mains, une manière fiable de déterminer le taux de modifications (résultats non montrés). D'autre part cela n'apporte aucune indication sur le type de modifications introduites. Nous avons donc décidé d'étudier plus précisément la nécessité de l'activité de DNA-PKcs pour former les JS.

Dans l'article 3 les JS formées lors du réarrangement du segment AJ58 étaient les moins modifiées. L'étendue des modifications semblant dépendre au moins en partie de la RSS du segment réarrangeant, nous avons donc étudié la jonction signal formée par la recombinaison de δ Rec-1 avec AJ58. Cette jonction est produite dans les thymocytes DP après la transition DN/DP et présente l'avantage d'être beaucoup plus fréquente que la jonction ADV2/AJ58. Elle est donc plus indicative des mécanismes de formations des JS d'une population globale de thymocytes. Si en plus elle est peu modifiée comme la JS ADV2/AJ58, les modifications induites par l'absence de p53 ou d'ATM devraient être facile à mettre en exergue. La région AJ n'est pas accessible au stade DN. Or la mutation de DNA-PKcs dans les souris SCID bloque la différenciation des lymphocytes T au stade DN3. Nous ne pouvons donc pas étudier la jonction δ Rec-1/AJ58 dans les souris SCID. Par contre les réarrangements des gènes TCRD se déroulent plus précocement et les JS formées sont alors présentes dans les souris SCID. Nous avons donc analysé en parallèle les JS formées durant le réarrangement des gènes TCRD dans les thymocytes DN.

Analyse des JS δ Rec-1/AJ58 dans les souris ATM et p53

Brièvement : la jonction est amplifiée avec deux amorces spécifiques des segments δ Rec-1 et AJ58 à partir de thymocytes totaux par 35 cycles de PCR. Le produit de PCR est purifié sur gel d'agarose et cloné dans le vecteur PGEM-T easy. L'insertion du fragment d'intérêt est vérifiée par hybridation avec une sonde interne spécifique de δ Rec-1 marquée au phosphore 32 pour identifier les clones positifs. Comme lors de l'analyse des jonctions δ Rec-1/AJ61 dans l'étude précédente, nous ne pouvons pas utiliser la présence ou l'absence d'un site ApaL1 pour identifier les JS modifiées puisque δ Rec-1 contient une séquence CACGTG. Donc, des clones positifs choisis au hasard ont donc été séquencés.

Chez la souris sauvage (C57BL/6) seuls 4 clones sur 22 séquencés présentent des modifications (18,2%) (Figure 15). Entre 2 et 4 bases non imputables à la séquence codante

des gènes réarrangés sont ajoutées. Aucun événement de délétion n'a pu être mis en évidence. Toutes les modifications proviennent de l'ajout de nucléotides N par la TdT en accord avec nos résultats précédents (article 3). Ce faible taux et la simplicité des modifications observées au niveau de la JS δ Rec-1/AJ58 chez la souris sauvage confirment que cette jonction est donc un excellent candidat pour étudier l'implication de protéines dans la formation des JS.

Les JS ont été amplifiées à partir d'ADN de thymocytes de souris $ATM^{-/-}$, et de souris $p53^{-/-}$ (Figure 15). En absence de p53, 5 JS sur 42 sont modifiées soit 11,9%. Entre 2 et 3 nucléotides sont ajoutés par la TdT et aucune délétion n'est retrouvée. Dans les souris délétées pour ATM, 14,3% des jonctions sont modifiées (3/21). Deux de ces JS comportent une addition de 3 et 5 nucléotides N. La troisième JS présente une délétion extrêmement étendue de 46 nucléotides. Les souris $ATM^{-/-}$ présentent des hypersensibilités aux radiations et des défauts des checkpoints régulant le cycle cellulaire à la transition G1/S, G2/M et en phase S (Zhang et al., 2004). Il a été montré qu'une déficience d'ATM s'accompagne en plus d'une instabilité du génôme provoquant des translocations chromosomiques et une augmentation de l'incidence des cancers (Bishop et al., 2000; Liyanage et al., 2000). Nous avons donc comparé la fréquence des délétions d'une telle ampleur entre les souris sauvage et $ATM^{-/-}$. Pour cela 400 colonies issues du clonage de la jonction Drec1/AJ58 chez les souris $ATM^{-/-}$ et C57BL/6 ont été hybridées avec 3 sondes radioactives différentes. La sonde TrecDrp hybride en bordure de l'amplicon δ Rec-1/AJ58 tandis que la 2^{ème} sonde, Drec1p2 est située près de la jonction des RSS (Figure 16). Les clones négatifs pour une de ces sondes, indiquant potentiellement une délétion étendue sont séquencés. La colonie comportant la jonction précédemment séquencée sert de témoin positif. Chez les souris sauvages et $ATM^{-/-}$ un et trois clones respectivement semblent comporter une délétion importante. Après séquençage, un clone provenant d'une souris $ATM^{-/-}$ comporte une jonction dont la séquence est identique à celle du témoin positif. Les autres jonctions se sont révélées irrelevantes. L'absence d'ATM ne semble donc pas favoriser de fortes délétions et/ou des coupures anormales au niveau des extrémités signal.

Au vu de ces résultats, il ne semble pas y avoir de différences significatives dans la structure des jonctions δ Rec-1/AJ58 formées dans une souris sauvage ou dans une souris mutée ou ne possédant pas ATM ou p53.

A/	Ref	AJ58		δ Rec-1		
		TGCAGTG	<i>TGCA</i>	<i>AGCA</i>	TGCAGTG	
C57BL/6		TGCAGTG			CACAGTG	18
		TGCAGTG	GTCA		CACAGTG	
		TGCAGTG	GGG		CACAGTG	
		TGCAGTG	GG		CACAGTG	
		TGCAGTG	AG		CACAGTG	
P53^{-/-}		TGCAGTG			CACAGTG	37
		TGCAGTG	GTTC		CACAGTG	
		TGCAGTG	GT		CACAGTG	
		TGCAGTG	CC		CACAGTG	
		TGCAGTG	CT		CACAGTG	
		TGCAGTG	AT		CACAGTG	
ATM^{-/-}		TGCAGTG			CACAGTG	18
		TGCAGTG	CTCCC		CACAGTG	
		TGCAGTG	AAG		CACAGTG	
		(-39)---			----(-7)	

B/	D	D+N	N	NM
ATM^{-/-}	4,8	0	9,6	85,6
p53^{-/-}	0	0	11,9	88,1
C57BL/6	0	0	18,2	81,8

Figure 15

Jonctions signal δ Rec-1/AJ58: A/ Séquences de JS. Les chiffres à gauche indiquent le nombre de fois où la séquence a été retrouvée. La colonne de droite indique la souche de souris à partir de laquelle les JS ont été amplifiées. La séquence de référence des RSS est donnée en gras en haut. La séquence codante adjacente est indiquée en italique. La colonne du milieu indique les nucléotides non codés par les RSS. Les nucléotides en gras peuvent provenir d'une coupure imprécise par la recombinaise au niveau de la séquence codante. Les délétions sont indiquées par des - ou par le nombre de pb délétées (ex: -39). **B/ Statistique des types de modifications en pourcentage.** Les colonnes indiquent pour chaque type de souris le % de JS modifiées par délétion (D), par délétion et addition (D+N), par addition (N) ainsi que le % de JS fidèles (NM)

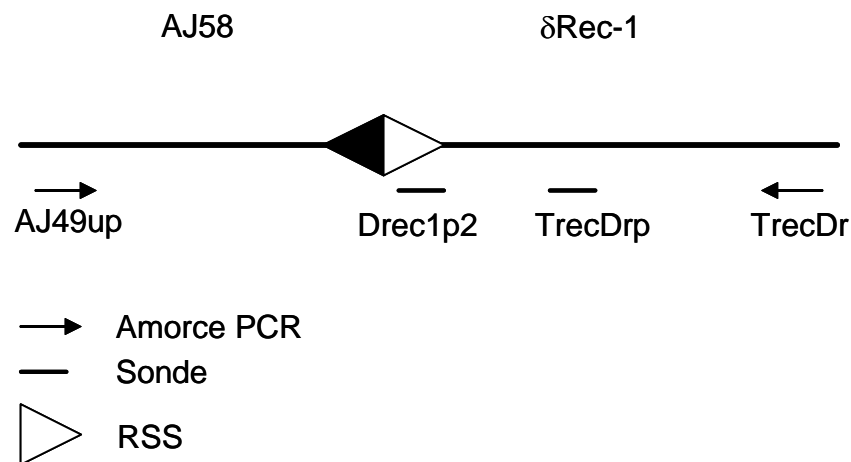


Figure 16:

Principe de détection des délétions étendues de la RSS de dRec-1.

La JS dRec-1/AJ58 est amplifiée par PCR avec les amorces AJ49up et TrecDr et le produit de PCR est cloné. Les clones sont ensuite hybridés avec deux sondes internes spécifiques de la RSS de dRec-1. Les clones positifs pour une seule sonde sont ensuite séquencés.

Fréquence de modification des JS DD1/DD2

Dans notre précédente étude sur la formation des JS nous avons montrés que l'identité des partenaires se réarrangeant pouvait influencer leur structure. D'autre part Talukder et al ont montrés qu'alors que les JS V β 14/D β 1 étaient parfaitement « normales » dans les souris exprimant la protéine Core RAG-1, la quasi totalité des JS D β 2/J β 2.1 comprenaient une large partie de la séquence codante de D β 2 (Talukder et al., 2004). Comme les nôtres (article 3), ces résultats indiquent que la RSS ou la séquence codante des segments réarrangés exercent une forte influence sur la structure des JS. L'affinité des protéines RAG pour la RSS peut en effet varier en fonction de sa séquence nucléotidique et induire ainsi des changements de stabilité ou de composition du complexe nucléoprotéique formé. Un défaut de recombinaison peut donc n'être visible que lors du réarrangement de certains gènes et nous avons donc analysé une autre jonction signal chez les souris sauvages, ATM^{-/-} et p53^{-/-}. Notre choix s'est porté sur la jonction signal DD1/DD2, afin de pouvoir en plus analyser le rôle éventuel de DNA-PKcs. Les souris SCID sont sur un fond génique CB17 et présentent

un arrêt de la différenciation des thymocytes au stade DN3. Pour être dans une situation similaire nous avons donc analysé les JS formées dans les souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ (notées $CD3\epsilon^{-/-}$) sur fond BALB/c en plus des souris C57BL/6 utilisée précédemment. La souris $CD3\epsilon^{-/-}$ présente en effet un blocage de la différenciation au même stade que la souris SCID et le fond BALB/c est relativement proche du fond CB17 de la souris SCID. La souris $CD3\epsilon^{-/-}$ représente donc un contrôle adéquat.

Les clones contenant le produit de PCR DD1/DD2 purifié ont été sélectionnés grâce à une sonde radioactive spécifique de DD2. Le fragment qu'ils contiennent a ensuite été amplifié par PCR puis digéré par APAL1 et seulement les plasmides des clones résistants seront préparés pour un séquençage ultérieur. Le rapport entre clones résistants et sensibles à la digestion permet de déterminer précisément le taux de modification. Les clones donnant un profil de digestion atypique ont été pour certains vérifiés par séquençage puis éliminés des statistiques. Vingt neuf JS provenant de souris C57BL/6 sur 43 se sont avérées modifiées soit 67,4% (Figure 17). Les JS amplifiées à partir d'ADN de thymocytes totaux de souris $CD3\epsilon^{-/-}$ présentent également un taux de modification très important: 73,8 % sont modifiées (31 sur 42 clones) (Figure 17). Pour chaque type de souris la variation de fréquence des modifications entre les individus est relativement faible (13,5% et 16% pour C57BL/6 et $CD3\epsilon^{-/-}$ respectivement). Cette JS s'avère extrêmement modifiée comparée à la JS $\delta Rec-1/AJ58$. La même analyse a été effectuée à partir d'ADN de thymocytes totaux de souris $ATM^{-/-}$, $p53^{-/-}$ et SCID.

	Sensibles	Résistants	% JS modifiées
SCID	1	42	97,60%
$ATM^{-/-}$	18	25	58,10%
$CD3\epsilon^{-/-}$	11	31	73,80%
C57BL/6	14	29	67,40%

Figure 17:

Jonctions signal DD1/DD2: Proportion des modifications des JS DD1/DD2. Les colonnes indiquent pour chaque type de souris le nombre de clones comportant des JS sensibles à la digestion ou résistants ainsi que le % de modification de la JS correspondant. Ces résultats ont été obtenus par digestion du produit d'amplification des JS présent dans les clones bactériens. Les profils de digestions atypiques ont été écartés des statistiques.

Le taux de modifications moyen des JS DD1/DD2 provenant de souris ATM^{-/-} est de 58,1% (25 sur 43 clones) (Figure 17). Le taux moyen de modification est plus faible que celui retrouvé dans les souris sauvages. Cependant une variation inter individus plus forte de la fraction des JS modifiées (entre 47,6% et 68% de clones modifiés) que pour les souris sauvages est constatée. Aucune différence dans les manipulations ne peut expliquer cette différence. Au moins une autre souris devra être analysée afin de pouvoir conclure à une différence significative du taux de modification en absence d'ATM. Les JS de souris p53^{-/-} présentent un taux moyen de modifications semblable à celui d'une souris sauvage soit 68% comparé à 67,4% chez C57BL/6 ou 73,8% chez les souris CD3ε^{-/-}. La présence de p53 sous forme active n'influence pas l'étendue des modifications introduites au niveau de la jonction DD1/DD2. Chez les souris SCID la situation est différente puisque 42 sur 43 des JS se sont révélées résistantes à la modification (Figure 3). La quasi-totalité des JS DD1/DD2 sont donc modifiées soit 97,6% en moyenne. Pour cette jonction, le taux de modification est donc plus élevé chez les souris déficientes pour l'activité de DNA-PKcs que chez les souris sauvages.

Nous avons montré ici que seule la mutation de DNA-PKcs influence le taux de modification de la jonction signal DD1/DD2. Il pourrait cependant y avoir une influence de p53 et ATM sur le type de modifications introduites au niveau de la JS. Nous avons donc séquencé les clones résistant à la digestion.

Type de modification des JS DD1/DD2

Les 16 jonctions séquencées chez la souris C57BL/6 présentent toutes des modifications par ajouts de nucléotides N. Aucune délétion n'est détectable. L'étude des nucléotides insérés met aussi en évidence l'ajout systématique d'un doublet de nucléotide AC attenant à l'heptamère de la RSS de DD1. Ce même doublet est aussi retrouvé au niveau des JS séquencées dans les souris CD3ε^{-/-} sur fond BALB/c, dans les souris p53, ATM^{-/-} et SCID. Ce doublet pourrait cependant provenir d'une coupure imprécise par la recombinaise puisque ces nucléotides sont aussi retrouvés dans la séquence codante de DD1. Cependant seules deux jonctions sur 15 chez les souris sauvages contiennent plus de 2 nucléotides pouvant être attribués à la séquence codante de DD1. Il semble peu probable qu'en cas de coupure imprécise celle-ci intervienne dans 90% des cas après ce doublet AC. D'autre part, aucune imprécision de coupure n'est détectable au niveau du partenaire de recombinaison utilisé simultanément : DD2. Enfin malgré toutes les JS que nous avons testées dans les souris sauvages, aucune n'a jamais présenté de modification imputable à une coupure imprécise par les protéines RAG (article 3). Nous suggérons plutôt que la RSS de DD1

pourrait être redéfinie en englobant le dinucléotide AC dans l’heptamère de la RSS de DD1 (Figure 18).

	Heptamère	Espaceur	Nonamère
RSS canonique	CACAGTG		ACAAAAACC
RSS 23 actuelle	CACAGTG	TGAAGTATATTAAACCTCTGTTC	AGAAACACT
RSS 23 redefinie	CACA CAG	TGTGAAGTATATTAAACCTCTGT	TCAGAAACA
RSS 25 redefinie	CACA CAG	TGTGAAGTATATTAAACCTCTGTTC	AGAAACACT

Figure 18:

Redéfinition fonctionnelle de la RSS de DD1. La séquence des RSS canonique et la RSS actuelle sont indiquées ligne 1 et 2. L’étude des séquence permet de déterminer la position de l’heptamère mais pas celle du nonamère. Les deux séquences possible de la RSS de DD1 avec un spaceur de 23 pb ou de 25 pb sont indiquées. Les nucléotides variant par rapport à la séquence de la RSS canonique sont en gras.

Cette hypothèse sera vérifiée en déterminant la position d’introduction de la coupure par LMPCR. Afin de nous conformer au dogme qui veut que les SJ ne soient pas ou très peu modifiées, et parce que nous pensons qu’il fait partie de la RSS de DD1, nous avons exclu ce doublet des statistiques ultérieures afin de diminuer la fréquence de modification de cette JS.

Chez la souris C57BL/6, de 1 à 6 nucléotides sont ajoutés par la TdT avec en moyenne 2,92 nucléotides par séquence (Figure 18A). Une JS présente une insertion atypique composé d’un segment DD1 et d’un segment DD2 presque complets. Ces deux segments semblent avoir réarrangés de manière non conventionnelle. La séquence retrouvée ici correspond en effet à un réarrangement mettant en jeu la RSS 5’ de DD1 avec la RSS 5’ de DD2. A la jonction de ces deux segments on peut noter l’ajout de 5 nucléotides N (CCCAA). Ce type de réarrangement avait déjà été mis en évidence par Kanari et al et sera écarté des statistiques (Kanari et al., 2003).

Dans les thymocytes immatures de souris CD3 $\epsilon^{-/-}$, 20 séquences sur 21 sont modifiées uniquement par ajout de nucléotides N (Figure 18B). Une jonction présente en plus une délétion d’un nucléotide au niveau de la RSS de DD1. Les JS comportent de 1 à 5 nucléotides avec en moyenne 2,33 nucléotides. Une seule JS comporte une délétion d’un nucléotide en plus d’un ajout de deux nucléotides N.

18A/

C57BL/6	DD2		DD1
Ref	CACCGTG <i>atcg</i>	<i>atat</i>	CACACAG
	CACCGTG	GGGGAG	CACACAG
	CACCGTG	AACT	CACACAG
	CACCGTG	GCA	CACACAG
	CACCGTG	CCT	CACACAG
	CACCGTG	TCC	CACACAG
	CACCGTG	AAA	CACACAG
	CACCGTG	AGA	CACACAG
	CACCGTG	ACA	CACACAG
	CACCGTG	AAC	CACACAG
	CACCGTG	GG	CACACAG
	CACCGTG	CC	CACACAG
	CACCGTG	AG	CACACAG
	CACCGTG	G	CACACAG
	CACCGTG	ATCGGAGGGATACGACCCAATGGCATAT	CACACAG

2

2

Figure 18:

Séquences de la JS DD1/DD2. Les chiffres à gauche indiquent le nombre de fois où la séquence a été retrouvée. La colonne de droite indique la souche de souris à partir de laquelle les JS ont été amplifiées. La séquence de référence des RSS est donnée en gras en haut. La séquence codante adjacente est indiquée en italique. La colonne du milieu indique les nucléotides non codés par les RSS. Les nucléotides en gras peuvent provenir d'une coupure imprécise par la recombinaise au niveau de la séquence codante. Les délétions sont indiquées par des – ou par le nombre de pb délétées (ex: -9).

Les JS sont amplifiées et clonées à partir de thymocytes totaux de souris **A/** C57BL/6, **B/** CD3e^{-/-}, **C/** ATM^{-/-}, **D/** SCID

En contraste avec les souris C57BL/6 et CD3e^{-/-}, 25,2% des JS modifiées chez les souris SCID comportent des délétions de 1 à 39 nucléotides (8 sur 31). Ces délétions affectent aussi bien la RSS de DD1 que de DD2. Plus de la moitié des séquences comportant une délétion comportent aussi un ajout de nucléotide N. L'ajout moyen de nucléotide N est de 2,58 soit pratiquement comme dans les souris sauvages (2,92). Il est important de noter que le dinucléotide AC est absent de la jonction uniquement dans les séquences qui comportent une délétion. Cette constatation renforce l'idée qu'il fait partie intégrante de l'heptamère de DD1 (Figure 18C).

18B/

CD3ε ^{-/-} Ref	DD2 CACCGTG	atcg	DD1 atat	CACACAG	
	CACCGTG	GTGGG		CACACAG	
	CACCGTG	GGG		CACACAG	2
	CACCGTG	GGT		CACACAG	
	CACCGTG	GAG		CACACAG	
	CACCGTG	GAG		CACACAG	
	CACCGTG	CCC		CACACAG	2
	CACCGTG	CAC		CACACAG	
	CACCGTG	TGT		CACACAG	
	CACCGTG	TTC		CACACAG	
	CACCGTG	GG		CACACAG	2
	CACCGTG	CC		CACACAG	
	CACCGTG	AC		CACACAG	
	CACCGTG	G		CACACAG	2
	CACCGTG	C		CACACAG	
	CACCGTG	C		CACACAG	
	CACCGTG	T		CACACAG	
	CACCGTG	T		CACACAG	
	CACCGTG	GG		CACACAG	
	CACCGTG	ATCGGAGGGATACGAGGGGGG		CACACAG	
	CACCGTG	ATCGGAGGGATACCTGTGGCATAT		CACACAG	

Chez les souris ATM, 3 JS sur 21 (14,3%) présentent des délétions (Figure 18D). Ces délétions entre 1 et 9 nucléotides sont moins étendues que dans les souris SCID et n'affectent que la RSS de DD2. On ne retrouve pas de délétion sans ajout de nucléotides N. Entre 2 et 10 nucléotides N sont insérés dans la jonction. Le nombre moyen de N ajoutés est supérieur à celui retrouvé dans les souris C57BL/6 soit 4,28 contre 2,92.

18C/

SCID	DD2	DD1	
Ref	CACCGTG <i>atcg</i>	<i>atat</i> CACACAG	
	CACCGTG	GGGGCCT	CACACAG
	CACCGTG	AACCC	CACACAG
	CACCGTG	CCCCC	CACACAG
	CACCGTG	GGGG	CACACAG
	CACCGTG	AGA	CACACAG
	CACCGTG	GAC	CACACAG
	CACCGTG	GGG	CACACAG
	CACCGTG	GCT	CACACAG
	CACCGTG	TCT	CACACAG
	CACCGTG	CCT	CACACAG
	CACCGTG	CAA	CACACAG
	CACCGTG	GGG	CACACAG 2
	CACCGTG	CCC	CACACAG
	CACCGTG	GTA	CACACAG
	CACCGTG	GGC	CACACAG 2
	CACCGTG	GTC	CACACAG
	CACCGTG	CTC	CACACAG
	CACCGTG	TCC	CACACAG
	CACCGTG	GG	CACACAG 4
	CACCGTG	CT	CACACAG
	CACCGTG	GA	CACACAG
	CACCGTG	G	CACACAG 2
	CACCGTG	G	CACACAG
	CACCGT-	CC	CACACAG
	CACCGTG	CG	-ACACAG
	CACCGTG	GG	---ACAG
	CACCGT-	AG	CACACAG
	(-7)----	G	-----G
	CACCGTG		--CACAG
	CACCGTG		--CACAG 2
	(-12)---		---(-27)
	CACCGTG	ATCGGAGGGAGGGGCATAT	CACACAG
	CACCGTG	ATCGGGGGCACGTGGCATAT	CACACAG

18D/

ATM^{-/-}	DD2	DD1
Ref	CACCGTG <i>atcg</i>	<i>atat</i> CACACAG
	CACCGTG	TGTTCAACGT
	CACCGTG	TATTCGAG
	CACCGTG	GGTCCCT
	CACCGTG	GGGGAG
	CACCGTG	GGACC
	CACCGTG	AGTAA
	CACCGTG	AGGCC
	CACCGTG	CCCC
	CACCGTG	GGG
	CACCGTG	GGG
	CACCGTG	CGC
	CACCGTG	CCC
	CACCGTG	TTT
	CACCGTG	CC
	CACCGTG	CG
	CACCGTG	GG
	CACCGTG	AA
	CACCGTG	TT
	CACCG--	CGGGATTCT
	CACCG--	GGGG
	(-9)----	GA
	CACC---	GGTGGCATA
	CACCG--	CCGTGGCATA
	CACCGTG	ATCGGAGGGATACGAGCTCGTGGCATAT
		CACACAG

2

Conclusion

L'analyse des jonctions signal δ Rec-1/AJ58 et DD2/DD1 chez les souris sauvages apportent des informations intéressantes sur les mécanismes de réarrangements. Les résultats obtenus montrent en effet une très forte influence des partenaires de recombinaison sur le taux de modification des JS. Ainsi les JS DD2/DD1 sont près de 4 fois plus modifiées que les JS δ Rec-1/AJ58. L'influence de la RSS et de la séquence codante sur le pattern de modification des JC avait déjà été démontrée (Ezekiel et al., 1995; Ezekiel et al., 1997; Nadel and Feeney, 1997). Notre étude montre donc que ces résultats sont extrapolables à la formation des JS. Le traitement des JS et des JC avant la ligation semble donc similaire. De plus ces résultats mettent encore une fois en évidence l'activité prédominante de la TdT dans l'introduction des modifications des JS ce qui renforce l'idée que les modifications des JS loin d'être une anomalie font partie intégrante du mécanisme de la recombinaison (Figure 19).

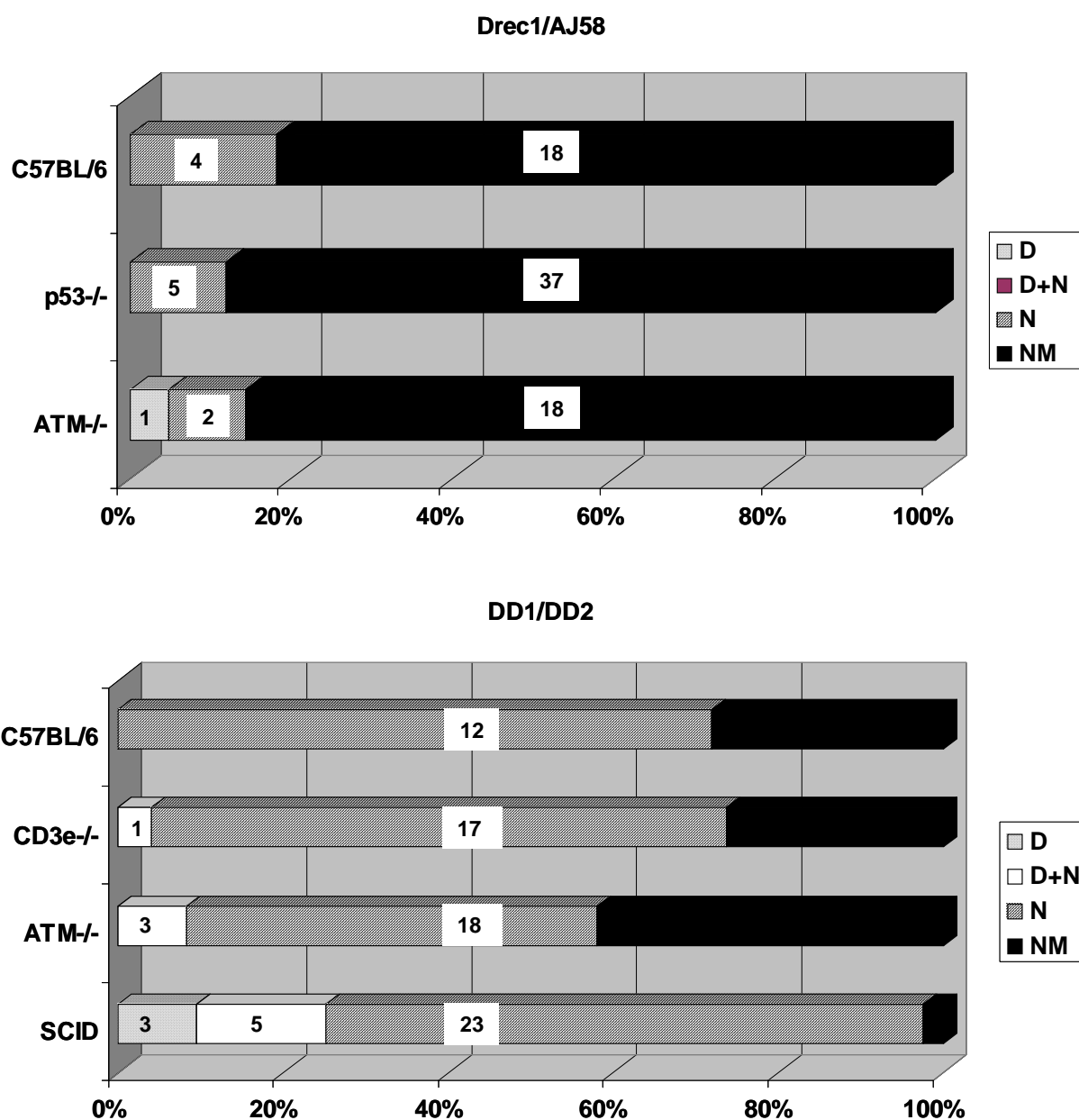


Figure 19:

Récapitulatif de l'influence des différentes protéines sur les modifications des JS. Chaque barre représente 100% des JS retrouvées dans chaque type de souris. Le % de JS modifiées par délétion (D), par délétion et addition (D+N), par addition (N) ainsi que le % de JS fidèles (NM) est indiqué en abscisse. Les chiffres inscrits dans les barres indiquent le nombre de séquences qui ont été réalisées.

Alors que seuls des thymocytes DN sont présents dans les souris CD3ε^{-/-}, ils ne représentent que 5-8% des thymocytes chez la souris C57BL/6. La comparaison des JS entre ces deux populations de thymocytes : une mature avec une faible proportion de LT γδ ayant réarrangé DD1 avec DD2 et une population immature composée exclusivement de DN ne montre pas de différences significatives dans leur structure. La sélection β et l'engagement dans la voie αβ ne provoquent pas de biais de sélection dans les cellules ayant réarrangé les gènes DD1 et DD2.

Concernant le rôle des protéines de réparation et de maintien de la stabilité du génome, un premier point important apparaît : leur influence sur la structure des JS dépend des gènes se réarrangeant comme le montre clairement l'absence d'effet visible d'ATM sur la jonction δRec-1/AJ58 alors que son absence augmente l'incidence des délétions au niveau de la jonction signal DD1/DD2 (Figure 19). Ce résultat rappelle fortement les résultats présentés dans l'étude de Talkuder sur l'influence de la région core RAG-1 et core RAG-2 sur la recombinaison. Nous montrons aussi ici que le taux de modifications des JS déterminé par digestion du produit de PCR et/ou de clone n'est pas forcément indicatif de l'influence d'une protéine dans le processus de formation des JS. Seul le séquençage apparaît indicatif. Enfin contrairement à l'étude de Bogue et al (Bogue et al., 1997), il apparaît que dans les souris SCID, le taux de modification des JS est fortement augmenté. Cette augmentation est principalement due à une augmentation des délétions. En effet le taux de jonctions modifiées uniquement par l'ajout de nucléotide N (72,4%) est comparable à celui retrouvé dans les souris sauvages et CD3ε (67,4 et 69,7% respectivement). Ces délétions pourraient être dues à une résolution aberrante des extrémités signal par un processus de réparation alternatif comme suggéré au niveau des extrémités codantes. Cependant nous proposons un modèle où la phosphorylation d'Artémis par ATM et DNA-PKcs inhibe son activité exonucléase et permet de protéger les extrémités signal avant leur ligation (Figure 20). Dans ce modèle l'activité exonucléase constatée au niveau des extrémités codantes dépendrait uniquement de l'action d'Artémis et non d'une exonucléase encore inconnue. Nous ne pouvons cependant pas exclure que l'absence d'ATM prive la cellule du checkpoint ATM/p53 qui bloque le cycle cellulaire en absence d'une résolution des extrémités signal. Dans ce cas les jonctions signal présentant des délétions pourraient être formées en dehors de la phase G0/G1 par un système de réparation alternatif au NHEJ. Si les JS DD1/DD2 formées dans les souris p53^{-/-} ne présentent pas d'augmentation des modifications par délétion, nous pourrions exclure cette dernière hypothèse. En effet nous pouvons raisonnablement nous attendre à ce que comme

dans les souris $ATM^{-/-}$, le checkpoint ATM/p53 soit inactivé. p53 peut cependant avoir des fonctions indépendantes d'ATM.

Pour finir, l'étude de la structure des JS en absence d'Artémis pourrait permettre de déterminer si cette protéine est bien responsable des délétions observées. Cette question ne peut en effet pas être résolue par l'analyse des jonctions codantes puisqu'en absence d'Artémis, l'épingle à cheveux n'est pas résolue. Ces études complémentaires permettront d'améliorer notre compréhension des mécanismes de la recombinaison V(D)J.

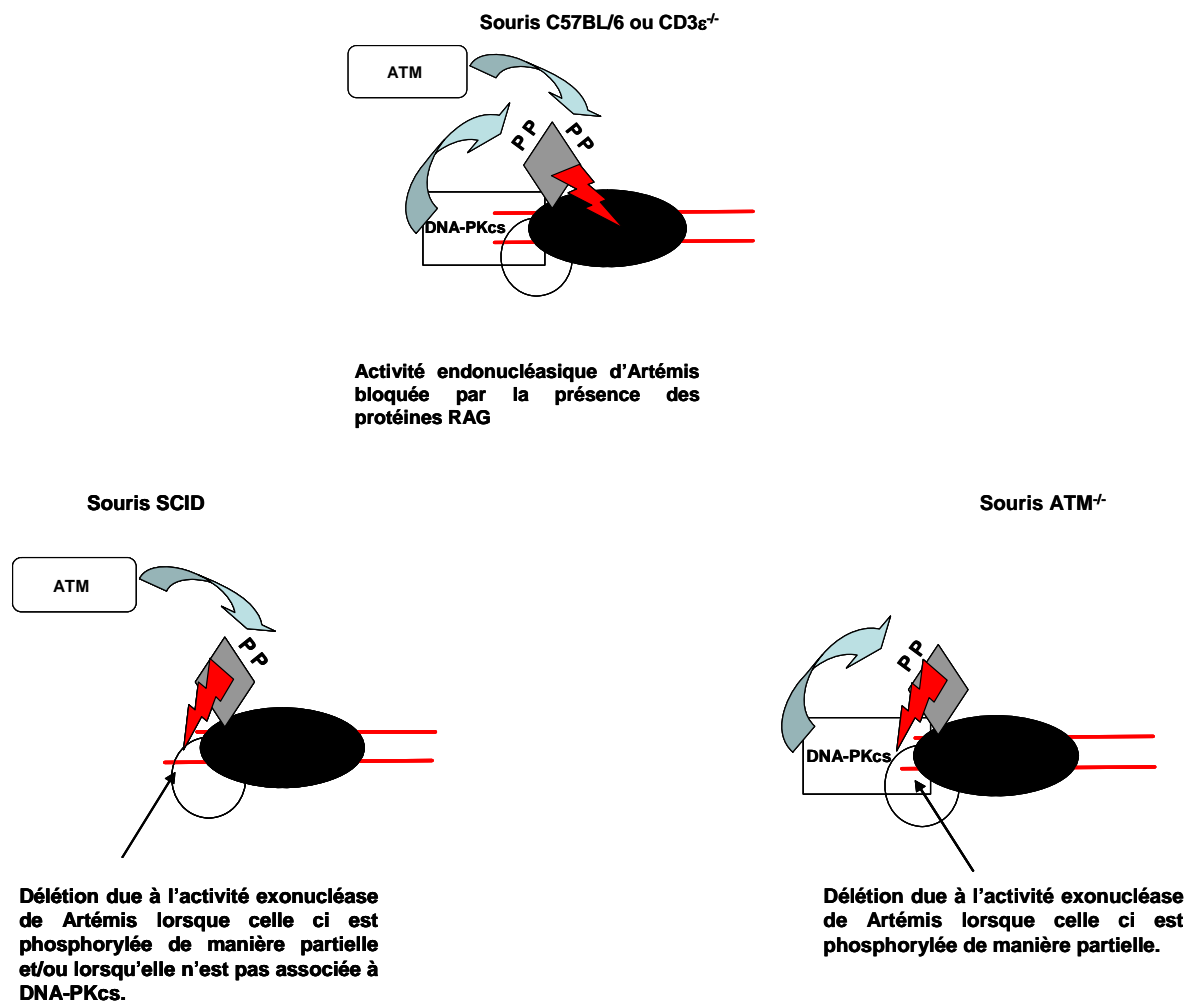


Figure 20:

Modèle pour le contrôle de l'activité exonucléasique d'Artémis. La phosphorylation conjointe d'Artémis par ATM et DNA-PKcs ainsi que son association physique à DNA-PKcs inhibe son activité exonucléasique. En absence d'ATM la phosphorylation n'est pas complète et Artémis garde une activité exonucléasique suffisante pour digérer les extrémités signal. Dans les souris SCID la perte de l'activité kinase et/ou l'absence de la sous-unité DNA-PKcs (du fait de la diminution de la quantité de protéine disponible) du complexe postclivage produit le même effet.

CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

Il avait été montré que, chez les souris $RAG^{-/-}$ et SCID, l'exposition aux radiations ionisantes induit la reprise de la différenciation des thymocytes. Chez les souris SCID, l'irradiation permet de résoudre les intermédiaires de réarrangement des gènes $TCRB$ et donc, très probablement, d'exprimer une chaîne β dans le contexte d'un pré-TCR. Chez ces souris c'est donc la restauration de l'expression du pré-TCR qui explique la différenciation radio-induite des thymocytes immatures jusqu'au stade DP. Toutefois aucune restauration du réarrangement $TCRA$ n'est détectée. Chez les souris $RAG^{-/-}$, la différenciation radio-induite a logiquement lieu en absence de tout réarrangement. L'irradiation induit des signaux qui miment/reproduisent les signaux issus du pré-TCR. Afin d'adresser plus précisément l'implication des composants de la voie de signalisation du pré-TCR dans la restauration de la différenciation des thymocytes immatures et la capacité de l'irradiation à promouvoir le réarrangement des gènes $TCRA$, nous avons analysé ce phénomène chez des souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ irradiées. Le blocage de la différenciation dans ces souris provient de leur inaptitude à assembler un complexe pré-TCR en absence d'expression des chaînes $CD3\epsilon$, δ et γ . Ces souris réarrangent normalement leurs gènes $TCRB$ puisqu'elles possèdent une machinerie de recombinaison fonctionnelle. L'irradiation de souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ restaure le développement des thymocytes immatures ; la quantité de DP radio-induite est directement corrélée à la dose d'exposition de ces souris aux radiations ionisantes. La comparaison de l'efficacité de la différenciation radio-induite entre les souris $RAG^{-/-}$ et $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ suggère l'existence de deux voies de réponse à l'irradiation, l'une dépendante et l'autre indépendante de l'expression du complexe CD3. Nos travaux ont aussi montré que la réponse à l'irradiation est abolie en l'absence d'une protéine LAT fonctionnelle. Les deux voies de réponse à l'irradiation sont donc intégrées par cette protéine majeure de la signalisation pré-TCR et TCR. Dans les souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$, l'irradiation s'accompagne d'une augmentation du réarrangement des gènes $TCRA$. Pour mieux caractériser cette augmentation nous avons analysé les jonctions signal correspondantes, portées par des TRECs. Chaque TREC reflète un événement de réarrangement et comme ils ne se répliquent pas au cours de la division cellulaire, leur niveau n'est pas affecté par la prolifération cellulaire. Ces événements sont détectables dans les souris $CD3\epsilon^{\Delta5/\Delta5}$ uniquement après l'irradiation. L'augmentation du niveau de réarrangement $TCRA$ observé est donc dû à de nouveaux événements de recombinaison. Comme dans les souris sauvages l'induction des réarrangements n'est détectable que dans les thymocytes DP.

Ce résultat suggère que le réarrangement TCRA dépend du passage radio-induit du stade DN au stade DP et non d'une action directe de l'irradiation sur le réarrangement des gènes TCRA. Afin d'exclure l'implication du recrutement de système(s) de réparation autre que la machinerie traditionnelle de recombinaison V(D)J dans le réarrangement TCRA suite à l'irradiation, nous avons comparé la structure des produits de recombinaison dans une souris CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ irradiée. Nous avons choisi d'étudier la structure des jonctions signal qui est beaucoup plus simple que celle de la jonction codante. En contradiction avec les données de la littérature, nous avons mis en évidence, chez les souris sauvages et chez les souris CD3 $\epsilon^{\Delta 5/\Delta 5}$ irradiées un taux important de modification dans les jonctions signal. Nos résultats montrent cependant que le taux de modification des JS dans une souris CD3 et une souris sauvage est comparable. Le réarrangement TCRA présent dans les souris CD3 irradiées est donc très certainement le fruit de la recombinaison V(D)J et des protéines du NHEJ.

Nous avons alors étudié la structure des JS dans les souris sauvages. Cette étude montre qu'une fraction significative des jonctions signal formées lors du réarrangement TCRA est modifiée. Le taux de modification dépend des gènes réarrangés. Ces modifications sont dues à l'activité de la TdT ainsi que, plus rarement, à des délétions. Le profil de modification est différent entre les gènes TCRD et TCRA. La composition du complexe post-clivage ou l'activité des protéines le composant diffère donc selon le locus considéré. Historiquement les premières séquences de JS à être publiées résultaient du réarrangement de gènes codant pour les chaînes d'immunoglobuline (Alt and Baltimore, 1982; Lewis et al., 1984; Lewis et al., 1985). Ces JS ne présentaient pas de modifications, d'où la notion « d'asymétrie ». Depuis la plupart des études et des revues décrivent les JS comme la fusion parfaite de deux RSS. Nos résultats montrent que, quelles que soient les combinaisons de gènes TCRA et TCRD testées, il y a toujours une fraction de JS modifiées. Dans tous les cas la majorité de ces modifications provient de l'action de la TdT. Nous proposons donc que la diversité jonctionnelle des JS est une propriété intrinsèque de la recombinaison V(D)J au même titre que la diversité jonctionnelle des jonctions codantes.

Récemment l'intérêt pour la quantification des TRECs δ Rec-1/AJ61 s'est fortement développé. D'autre part la fréquence du réarrangement δ Rec-1/AJ61 chez l'homme en fait un événement facile à détecter. Cette propriété permet donc, en mesurant la quantité de SJ δ Rec-1/AJ61 dans les lymphocytes périphériques, d'estimer la production thymique. Cette estimation est très utile dans les cas de greffe de moelle osseuse afin d'estimer la prise du greffon. Elle permet aussi d'adapter les traitements immunosuppresseur dans de nombreuses

maladies. C'est aussi une technique couramment utilisée durant le traitement des infections VIH. Cette mesure doit cependant être prise avec précaution puisqu'elle peut être faussée par des variations de la prolifération homéostatique des LT ou de la prolifération suite à la rencontre d'un Ag. D'autre part nos résultats mettent en exergue une diversité combinatoire élevée des réarrangements de δ Rec-1 ainsi que des modifications d'une proportion non négligeable de ces jonctions signal (article 3). Mesurer uniquement la quantité de JS δ Rec-1/AJ61 amène très probablement à sous estimer la fonctionnalité thymique. Cette sous estimation est d'autant plus importante que certaines études par PCR quantitative sont effectuées avec une sonde « Taqman » située exactement sur la jonction, à cheval entre les deux RSS. Cette sonde ne pourra donc pas s'hybrider sur les jonctions modifiées et une fraction des TRECs ne sera pas prise en compte. Dans les cas de greffe où l'analyse de réarrangements TCR fait souvent apparaître des profils de réarrangements oligoclonaux, la reprise de la lymphopoïèse T pourrait passer inaperçue du fait de l'utilisation d'un autre accepteur AJ par δ Rec-1.

La diversité des JS formées lors du réarrangement de δ Rec-1 dans une population de LT est facilement déterminable par PCR. Le nombre de combinaisons δ Rec-1/AJ amplifiées donne déjà une première idée de cette diversité. Dans les échantillons de PBL de donneurs sain que nous avons testé, les TRECs comportant la RSS de δ Rec-1 fusionnée à AJ61, 58, 57 et 56 sont systématiquement retrouvés. Les autres combinaisons sont plus variables. Le produit d'amplification par PCR de la ou des combinaisons retrouvées peut ensuite être digéré par ApaL1. Un produit totalement résistant ou totalement sensible à la digestion indique une diminution de la diversité des JS. Ces deux paramètres (nombre de combinaisons δ Rec-1/AJ et sensibilité de ces combinaisons à la digestion) permettent de déterminer la diversité d'une population de lymphocytes T. L'avantage de cette approche par rapport aux méthodes classiques d'étude de la diversité des lymphocytes T, analyse par cytométrie en flux des gènes V β exprimés en surface des LT ou Immunoscope, est qu'elle nécessite très peu de matériel et peut donc facilement être mise en œuvre à partir de biopsies. De plus, elle ne nécessite pas l'extraction d'ARN souvent plus fragiles que l'ADN et, pour finir c'est une méthode simple, rapide et peu coûteuse. Son application est envisageable dans des cas de myélome afin de suivre la diversification des TCR, et donc des lymphocytes T, après la greffe de moelle, où dans des cas de lymphoprolifération anormale, afin de déterminer la clonalité des lymphocytes qui se multiplient de manière anormale. Un exemple d'application sur des

lymphocytes provenant d'un patient atteint de lymphoprolifération est montré dans la figure 21.

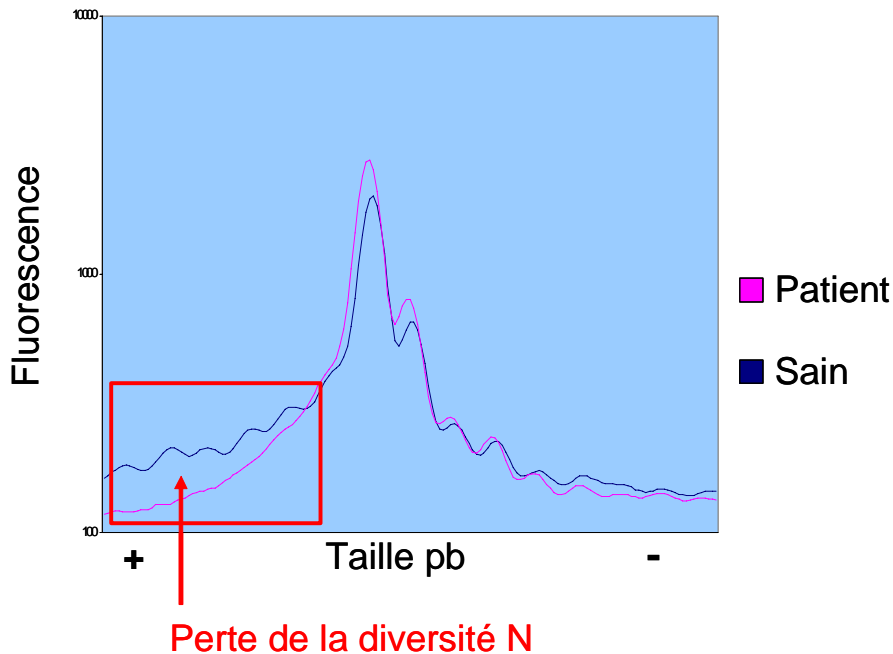


Figure 21 : Analyse de la JS δ Rec-1/AJ61 dans un cas de lymphoprolifération. L'analyse de longueur de fragment met en évidence une diminution de la diversité des JS présents dans les LT périphériques du patient atteint de lymphoprolifération (Perte de la diversité N).

Enfin, pour terminer, l'analyse de la diversité des jonctions signal pourrait également être utilisée pour tester la fonctionnalité des facteurs impliqués dans la formation des jonctions signal. Nos travaux montrent en effet de manière très claire que les jonctions DD1/DD2 réalisées chez les souris SCID et, dans une moindre mesure, $ATM^{-/-}$, présentent un taux élevé de délétions des RSS. Ces délétions semblent résulter spécifiquement de l'absence d'activité DNA-PKcs et ATM, puisqu'elles ne sont pas retrouvées chez les souris possédant ces activités. Il n'existe pas d'équivalent humain à la mutation affectant DNA-PKcs chez les souris SCID. Par contre, un nombre conséquent de patients est diagnostiqué pour une ataxie téléangiectasie. Il sera intéressant de déterminer le profil de modification des jonctions signal chez ces patients par rapport à des donneurs sains, afin éventuellement d'amener un nouvel élément permettant de faciliter le diagnostic.

L'analyse de la diversité jonctionnelle des TRECs par amplification/clonage/séquençage est certes fastidieuse, mais nous avons pu mettre en évidence, chez les souris SCID, la présence de délétions au niveau des jonctions DD1/DD2 par un test global de la diversité des réarrangements (Figure 22).

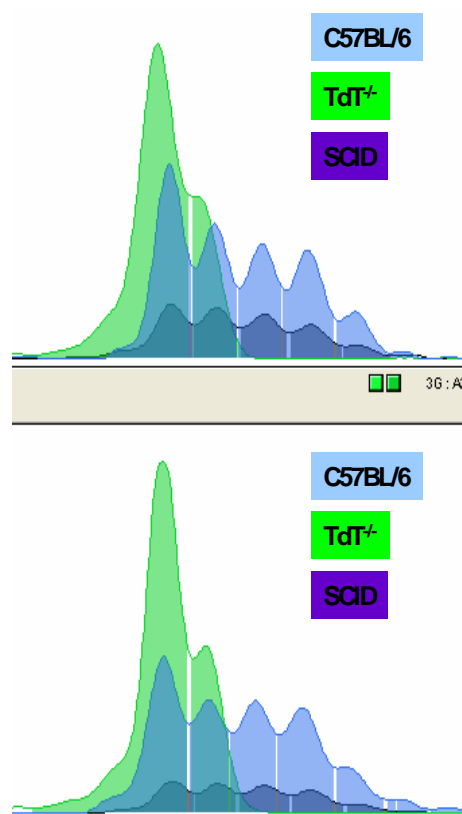


Figure 22: Etude de la JS par analyse de longueur de fragment.

Deux groupes différents de souris C57BL/6, TdT^{-/-} et SCID ont été testés.

Le pic le plus à gauche correspond à la taille de la jonction non modifiée. Chaque fragment modifié par l'ajout d'une pb est visualisé par un pic situé plus à droite. On estime que pour qu'une modification de la taille de la JS soit détectable il faut que la nouvelle espèce représente au moins 10% de la population totale.

Dans la souris sauvage les JS sont diversifiés. Le pic principal représente la taille de fragment attendue puisqu'il est parfaitement aligné avec le pic majoritaire présent dans la TdT. Ce pic est le plus important. Les JS présentant des additions de 1 à 5 pb sont détectées. En absence de TdT, la jonction ne présente peu de diversité. Dans les souris SCID, le profil de modification change puisque la hauteur et l'aire des pics représentant les différentes tailles de JS sont toutes équivalentes. Cela indique une diminution de la fréquence des JS non modifiées.

Il devrait donc être possible de développer une approche similaire pour l'étude de la diversité des jonctions signal chez l'homme, pour déterminer la fonctionnalité des facteurs, dont ATM est un exemple, qui participent, directement ou indirectement, à la résolution des extrémités signal durant la recombinaison des gènes TCR.

Ce travail a récemment donné lieu au dépôt d'un brevet CEA/INSERM : « Procédé de détermination de la diversité des lymphocytes T dans un échantillon biologique ». Candéias SM, Touvrey C, Jouvin-Marche E, Marche PN.

BIBLIOGRAPHIE

Agrawal, A., Eastman, Q. M., and Schatz, D. G. (1998). Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394, 744-751.

Agrawal, A., and Schatz, D. G. (1997). RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination. *Cell* 89, 43-53.

Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Buer, J., and von Boehmer, H. (1998). On the role of the pre-T cell receptor in alphabeta versus gammadelta T lineage commitment. *Immunity* 9, 649-655.

Aifantis, I., Buer, J., von Boehmer, H., and Azogui, O. (1997). Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus [published erratum appears in *Immunity* 1997 Dec;7(6):following 895]. *Immunity* 7, 601-607.

Akashi, K., Richie, L. I., Miyamoto, T., Carr, W. H., and Weissman, I. L. (2000). B lymphopoiesis in the thymus. *J Immunol* 164, 5221-5226.

Alam, S. M., Travers, P. J., Wung, J. L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S. C., and Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-620.

Alcover, A., Mariuzza, R. A., Ermonval, M., and Acuto, O. (1990). Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *J Biol Chem* 265, 4131-4135.

Alt, F. W., and Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4118-4122.

Anderson, S. J., Abraham, K. M., Nakayama, T., Singer, A., and Perlmutter, R. M. (1992). Inhibition of T-cell receptor beta-chain gene rearrangement by overexpression of the non-receptor protein tyrosine kinase p56lck. *EMBO J* 11, 4877-4886.

Ashton-Rickardt, P. G., Bandeira, A., Delaney, J. R., Van Kaer, L., Pircher, H. P., Zinkernagel, R. M., and Tonegawa, S. (1994). Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76, 651-663.

Autero, M., Saharinen, J., Pessa-Morikawa, T., Soula-Rothhut, M., Oetken, C., Gassmann, M., Bergman, M., Alitalo, K., Burn, P., Gahmberg, C. G., and et al. (1994). Tyrosine phosphorylation of CD45 phosphotyrosine phosphatase by p50csk kinase creates a binding site for p56lck tyrosine kinase and activates the phosphatase. *Mol Cell Biol* 14, 1308-1321.

Balciunaite, G., Ceredig, R., and Rolink, A. G. (2005). The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. *Blood* 105, 1930-1936.

Bassing, C. H., Alt, F. W., Hughes, M. M., D'Auteuil, M., Wehrly, T. D., Woodman, B. B., Gartner, F., White, J. M., Davidson, L., and Sleckman, B. P. (2000). Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature* 405, 583-586.

Benavides, F., Venables, A., Poetschke Klug, H., Glasscock, E., Rudensky, A., Gomez, M., Martin Palenzuela, N., Guenet, J. L., Richie, E. R., and Conti, C. J. (2001). The CD4 T cell-deficient mouse mutation *nack* (*nkt*) involves a deletion in the cathepsin L (*CtsL*) gene. *Immunogenetics* 53, 233-242.

Bhandoola, A., Cibotti, R., Punt, J. A., Granger, L., Adams, A. J., Sharrow, S. O., and Singer, A. (1999). Positive selection as a developmental progression initiated by alpha beta TCR signals that fix TCR specificity prior to lineage commitment. *Immunity* 10, 301-311.

Bishop, A. J., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A. J., and Schiestl, R. H. (2000). *Atm* deficiency causes an increased frequency of intrachromosomal homologous recombination in mice. *Cancer Res* 60, 395-399.

Blackwell, T. K., Malynn, B. A., Pollock, R. R., Ferrier, P., Covey, L. R., Fulop, G. M., Phillips, R. A., Yancopoulos, G. D., and Alt, F. W. (1989). Isolation of scid pre-B cells that rearrange kappa light chain genes: formation of normal signal and abnormal coding joins. *Embo J* 8, 735-742.

Blumberg, R. S., Alarcon, B., Sancho, J., McDermott, F. V., Lopez, P., Breitmeyer, J., and Terhorst, C. (1990). Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *J Biol Chem* 265, 14036-14043.

Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A., and et al. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 80, 813-823.

Blunt, T., Gell, D., Fox, M., Taccioli, G. E., Lehmann, A. R., Jackson, S. P., and Jeggo, P. A. (1996). Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10285-10290.

Bogue, M., Candéias, S., Benoist, C., and Mathis, D. (1991). A special repertoire of alpha:beta T cells in neonatal mice. *EMBO J* 10, 3647-3654.

Bogue, M., Gilfillan, S., Benoist, C., and Mathis, D. (1992). Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11011-11015.

Bogue, M. A., Wang, C., Zhu, C., and Roth, D. B. (1997). V(D)J recombination in Ku86-deficient mice: distinct effects on coding, signal, and hybrid joint formation. *Immunity* 7, 37-47.

- Bogue, M. A., Zhu, C., Aguilar-Cordova, E., Donehower, L. A., and Roth, D. B. (1996). p53 is required for both radiation-induced differentiation and rescue of V(D)J rearrangement in scid mouse thymocytes. *Genes Dev* 10, 553-565.
- Bolland, S., and Ravetch, J. V. (1999). Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. *Adv Immunol* 72, 149-177.
- Bousso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S., and Robey, E. (2002). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876-1880.
- Bouvier, G., Watrin, F., Naspetti, M., Verthuy, C., Naquet, P., and Ferrier, P. (1996). Deletion of the mouse T-cell receptor beta gene enhancer blocks alphabeta T-cell development. *ProcNatlAcadSciUSA* 93, 7877-7881.
- Brown, M. L., and Chang, Y. (2000). Metabolism of recombination coding ends in scid cells. *J Immunol* 164, 4135-4142.
- Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T. I., Yamashita, Y., Sharrow, S. O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13, 59-71.
- Cabaniols, J. P., Fazilleau, N., Casrouge, A., Kourilsky, P., and Kanellopoulos, J. M. (2001). Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Exp Med* 194, 1385-1390.
- Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K. W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111, 967-979.
- Call, M. E., Pyrdol, J., and Wucherpfennig, K. W. (2004). Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 23, 2348-2357.
- Calsou, P., Delteil, C., Frit, P., Drouet, J., and Salles, B. (2003). Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *J Mol Biol* 326, 93-103.
- Candeias, S., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1991). The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *J Exp Med* 174, 989-1000.
- Capone, M., Hockett, R. D., Jr., and Zlotnik, A. (1998). Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *ProcNatlAcadSciUSA* 95, 12522-12527.
- Capone, M., Watrin, F., Fernex, C., Horvat, B., Krippl, B., Wu, L., Scollay, R., and Ferrier, P. (1993). TCR beta and TCR alpha gene enhancers confer tissue- and stage-specificity on V(D)J recombination events. *EMBO J* 12, 4335-4346.

Casanova, J. L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P., and Maryanski, J. L. (1991). T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J Exp Med* 174, 1371-1383.

Ceredig, R., and Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2, 888-897.

Chan, D. W., Chen, B. P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M. D., Qin, J., and Chen, D. J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* 16, 2333-2338.

Chao, C., Saito, S. i., Anderson, C. W., Appella, E., and Xu, Y. (2000). Phosphorylation of murine p53 at Ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *PNAS* 97, 11936-11941.

Chen, L., Morio, T., Minegishi, Y., Nakada, S., Nagasawa, M., Komatsu, K., Chessa, L., Villa, A., Lecis, D., Delia, D., and Mizutani, S. (2005). Ataxia-telangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage. *Cancer Sci* 96, 134-141.

Cheng, A. M., Negishi, I., Anderson, S. J., Chan, A. C., Bolen, J., Loh, D. Y., and Pawson, T. (1997). The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9797-9801.

Chien, Y. H., Iwashima, M., Wettstein, D. A., Kaplan, K. B., Elliott, J. F., Born, W., and Davis, M. M. (1987). T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 330, 722-727.

Chun, J. J., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Jaenisch, R., and Baltimore, D. (1991). The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* 64, 189-200.

Ciofani, M., Schmitt, T. M., Ciofani, A., Michie, A. M., Cuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J. L., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2004). Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* 172, 5230-5239.

Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., and Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways [see comments]. *Nature* 362, 849-852.

Clayton, L. K., D'Adamio, L., Howard, F. D., Sieh, M., Hussey, R. E., Koyasu, S., and Reinherz, E. L. (1991). CD3 eta and CD3 zeta are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5202-5206.

- Clayton, L. K., Diener, A. C., Lerner, A., Tse, A. G., Koyasu, S., and Reinherz, E. L. (1992). Differential regulation of T-cell receptor processing and surface expression affected by CD3 theta, an alternatively spliced product of the CD3 zeta/eta gene locus. *J Biol Chem* 267, 26023-26030.
- Clements, J. L., Yang, B., Ross-Barta, S. E., Eliason, S. L., Hrstka, R. F., Williamson, R. A., and Koretzky, G. A. (1998). Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281, 416-419.
- Dai, Y., Kysela, B., Hanakahi, L. A., Manolis, K., Riballo, E., Stumm, M., Harville, T. O., West, S. C., Oettinger, M. A., and Jeggo, P. A. (2003). Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2462-2467.
- Danska, J. S., Holland, D. P., Mariathasan, S., Williams, K. M., and Guidos, C. J. (1996). Biochemical and genetic defects in the DNA-dependent protein kinase in murine scid lymphocytes. *Mol Cell Biol* 16, 5507-5517.
- Danska, J. S., Pflumio, F., Williams, C. J., Huner, O., Dick, J. E., and Guidos, C. J. (1994). Rescue of T cell-specific V(D)J recombination in SCID mice by DNA-damaging agents. *Science* 266, 450-455.
- Dave, V. P., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., and Kappes, D. J. (1997). CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *Embo J* 16, 1360-1370.
- de Villartay, J. P., Hockett, R. D., Coran, D., Korsmeyer, S. J., and Cohen, D. I. (1988). Deletion of the human T-cell receptor delta-gene by a site-specific recombination. *Nature* 335, 170-174.
- de Villartay, J. P., Lewis, D., Hockett, R., Waldmann, T. A., Korsmeyer, S. J., and Cohen, D. I. (1987). Deletional rearrangement in the human T-cell receptor alpha-chain locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8608-8612.
- Degermann, S., Surh, C. D., Glimcher, L. H., Sprent, J., and Lo, D. (1994). B7 expression on thymic medullary epithelium correlates with epithelium-mediated deletion of V beta 5+ thymocytes. *J Immunol* 152, 3254-3263.
- DeJarnette, J. B., Sommers, C. L., Huang, K., Woodside, K. J., Emmons, R., Katz, K., Shores, E. W., and Love, P. E. (1998). Specific requirement for CD3epsilon in T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14909-14914.
- Dembic, Z., Bannwarth, W., Taylor, B. A., and Steinmetz, M. (1985). The gene encoding the T-cell receptor alpha-chain maps close to the Np-2 locus on mouse chromosome 14. *Nature* 314, 271-273.
- Di Santo, J. P., and Rodewald, H. R. (1998). In vivo roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development. *Curr Opin Immunol* 10, 196-207.

- Diaz, P., Cado, D., and Winoto, A. (1994). A locus control region in the T cell receptor alpha/delta locus. *Immunity* 1, 207-217.
- Difilippantonio, M. J., McMahan, C. J., Eastman, Q. M., Spanopoulou, E., and Schatz, D. G. (1996). RAG1 mediates signal sequence recognition and recruitment of RAG2 in V(D)J recombination. *Cell* 87, 253-262.
- Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., *et al.* (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396, 690-695.
- Doyen, N., Boule, J. B., Rougeon, F., and Papanicolaou, C. (2004). Evidence that the long murine terminal deoxynucleotidyltransferase isoform plays no role in the control of V(D)J junctional diversity. *J Immunol* 172, 6764-6767.
- Doyen, N., d'Andon, M. F., Bentolila, L. A., Nguyen, Q. T., and Rougeon, F. (1993). Differential splicing in mouse thymus generates two forms of terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res* 21, 1187-1191.
- Dudley, E. C., Girardi, M., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1995). Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr Biol* 5, 659-669.
- Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1994). T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1, 83-93.
- Dzialo, R. C., and Cooper, M. D. (1997). An amphibian CD3 homologue of the mammalian CD3 gamma and delta genes. *Eur J Immunol* 27, 1640-1647.
- Ezekiel, U. R., Engler, P., Stern, D., and Storb, U. (1995). Asymmetric processing of coding ends and the effect of coding end nucleotide composition on V(D)J recombination. *Immunity* 2, 381-389.
- Ezekiel, U. R., Sun, T., Bozek, G., and Storb, U. (1997). The composition of coding joints formed in V(D)J recombination is strongly affected by the nucleotide sequence of the coding ends and their relationship to the recombination signal sequences. *Mol Cell Biol* 17, 4191-4197.
- Fehling, H. J., Iritani, B. M., Krotkova, A., Forbush, K. A., Laplace, C., Perlmutter, R. M., and von Boehmer, H. (1997). Restoration of thymopoiesis in pT alpha^{-/-} mice by anti- CD3epsilon antibody treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailless pT alpha. *Immunity* 6, 703-714.
- Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., and von Boehmer, H. (1995). Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* 375, 795-798.

Fernandez-Miguel, G., Alarcon, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E., and de la Hera, A. (1999). Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1547-1552.

Gahery-Segard, H., Jouvin-Marche, E., Six, A., Gris-Liebe, C., Malissen, M., Malissen, B., Cazenave, P. A., and Marche, P. N. (1996). Germline genomic structure of the B10.A mouse Tcr α -V2 gene subfamily. *Immunogenetics* 44, 298-305.

Gallagher, M., Candeias, S., Martinon, C., Borel, E., Malissen, M., Marche, P. N., and Jouvin-Marche, E. (1998). Use of TCR α gene segments by the delta chain is independent of their position and of CD3 expression. *Eur J Immunol* 28, 3878-3885.

Gallagher, M., Obeid, P., Marche, P. N., and Jouvin-Marche, E. (2001). Both TCR α and TCR delta chain diversity are regulated during thymic ontogeny. *J Immunol* 167, 1447-1453.

Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D. T., and Alt, F. W. (1998). A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity* 9, 367-376.

Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.

Gartner, F., Alt, F. W., Monroe, R., Chu, M., Sleckman, B. P., Davidson, L., and Swat, W. (1999). Immature thymocytes employ distinct signaling pathways for allelic exclusion versus differentiation and expansion. *Immunity* 10, 537-546.

Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175-1178.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.

Goldman, K. P., Park, C. S., Kim, M., Matzinger, P., and Anderson, C. C. (2005). Thymic cortical epithelium induces self tolerance. *Eur J Immunol* 35, 709-717.

Grassi, F., Barbier, E., Porcellini, S., von Boehmer, H., and Cazenave, P. A. (1999). Surface expression and functional competence of CD3-independent TCR zeta-chains in immature thymocytes. *J Immunol* 162, 2589-2596.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., and Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388, 492-495.

Groves, T., Smiley, P., Cooke, M. P., Forbush, K., Perlmutter, R. M., and Guidos, C. J. (1996). Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity* 5, 417-428.

Gu, Y., Seidl, K. J., Rathbun, G. A., Zhu, C., Manis, J. P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H. L., Sekiguchi, J. M., Frank, K., *et al.* (1997). Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 7, 653-665.

Guidos, C. J., Williams, C. J., Grandal, I., Knowles, G., Huang, M. T., and Danska, J. S. (1996). V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev* 10, 2038-2054.

Guidos, C. J., Williams, C. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Danska, J. S. (1995). Development of CD4+CD8+ thymocytes in RAG-deficient mice through a T cell receptor beta chain-independent pathway. *JExpMed* 181, 1187-1195.

Guo, J., Hawwari, A., Li, H., Sun, Z., Mahanta, S. K., Littman, D. R., Krangel, M. S., and He, Y. W. (2002). Regulation of the TCRalpha repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nat Immunol* 3, 469-476.

Haks, M. C., Krimpenfort, P., Borst, J., and Kruisbeek, A. M. (1998). The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalphabeta and TCRgammadelta lineages. *Embo J* 17, 1871-1882.

Haks, M. C., Lefebvre, J. M., Lauritsen, J. P., Carleton, M., Rhodes, M., Miyazaki, T., Kappes, D. J., and Wiest, D. L. (2005). Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. *Immunity* 22, 595-606.

Hamrouni, A., Aublin, A., Guillaume, P., and Maryanski, J. L. (2003). T cell receptor gene rearrangement lineage analysis reveals clues for the origin of highly restricted antigen-specific repertoires. *J Exp Med* 197, 601-614.

Havran, W. L., and Allison, J. P. (1988). Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 335, 443-445.

Hawwari, A., Bock, C., and Krangel, M. S. (2005). Regulation of T cell receptor alpha gene assembly by a complex hierarchy of germline Jalpha promoters. *Nat Immunol* 6, 481-489.

Hayes, S. M., Li, L., and Love, P. E. (2005). TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* 22, 583-593.

Hempel, W. M., Stanhope-Baker, P., Mathieu, N., Huang, F., Schlissel, M. S., and Ferrier, P. (1998). Enhancer control of V(D)J recombination at the TCRbeta locus: differential effects on DNA cleavage and joining. *Genes Dev* 12, 2305-2317.

Hesse, J. E., Lieber, M. R., Mizuuchi, K., and Gellert, M. (1989). V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* 3, 1053-1061.

Hockett, R. D., Jr., Nunez, G., and Korsmeyer, S. J. (1989). Evolutionary comparison of murine and human delta T-cell receptor deleting elements. *New Biol* 1, 266-274.

Hoffman, E. S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T. M., Schatz, D. G., Koff, A., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1996). Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev* 10, 948-962.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.

Houssaint, E., and Flajnik, M. (1990). The role of thymic epithelium in the acquisition of tolerance. *Immunol Today* 11, 357-360.

Housset, D., and Malissen, B. (2003). What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? *Trends Immunol* 24, 429-437.

Ikawa, T., Masuda, K., Lu, M., Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2004). Identification of the earliest prethymic T-cell progenitors in murine fetal blood. *Blood* 103, 530-537.

Irving, B. A., Alt, F. W., and Killeen, N. (1998). Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280, 905-908.

Isakov, N. (1998). Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors. *Adv Immunol* 69, 183-247.

Iwashima, M., Green, A., Davis, M. M., and Chien, Y. H. (1988). Variable region (V delta) gene segment most frequently utilized in adult thymocytes is 3' of the constant (C delta) region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8161-8165.

Iwashima, M., Irving, B. A., van Oers, N. S., Chan, A. C., and Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263, 1136-1139.

Jacobs, H., Vandeputte, D., Tolkamp, L., de Vries, E., Borst, J., and Berns, A. (1994). CD3 components at the surface of pro-T cells can mediate pre-T cell development in vivo. *Eur J Immunol* 24, 934-939.

Jiang, D., Lenardo, M. J., and Zuniga-Pflucker, C. (1996). p53 prevents maturation to the CD4+CD8+ stage of thymocyte differentiation in the absence of T cell receptor rearrangement. *J Exp Med* 183, 1923-1928.

Jones, J. M., and Gellert, M. (2003). Autoubiquitylation of the V(D)J recombinase protein RAG1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15446-15451.

Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191.

Jouvin-Marche, E., Aude-Garcia, C., Candeias, S., Borel, E., Hachemi-Rachedi, S., Gahery-Segard, H., Cazenave, P. A., and Marche, P. N. (1998). Differential chronology

of TCRADV2 gene use by alpha and delta chains of the mouse TCR. *Eur J Immunol* 28, 818-827.

Jouvin-Marche, E., Hue, I., Marche, P. N., Liebe-Gris, C., Marolleau, J. P., Malissen, B., Cazenave, P. A., and Malissen, M. (1990). Genomic organization of the mouse T cell receptor V alpha family. *Embo J* 9, 2141-2150.

Jung, D., Bassing, C. H., Fugmann, S. D., Cheng, H. L., Schatz, D. G., and Alt, F. W. (2003). Extrachromosomal recombination substrates recapitulate beyond 12/23 restricted VDJ recombination in nonlymphoid cells. *Immunity* 18, 65-74.

Kallenbach, S., Doyen, N., Fanton d'Andon, M., and Rougeon, F. (1992). Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2799-2803.

Kanari, Y., Muto, M., and Yamagishi, H. (2003). TCR delta gene rearrangements revealed by fine structure of the recombination junction in mice. *Microbiol Immunol* 47, 883-894.

Klotz, J. L., Barth, R. K., Kiser, G. L., Hood, L. E., and Kronenberg, M. (1989). Restriction fragment length polymorphisms of the mouse T-cell receptor gene families. *Immunogenetics* 29, 191-201.

Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261, 1171-1175.

Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

Kouskoff, V., Vonesch, J. L., Benoist, C., and Mathis, D. (1995). The influence of positive selection on RAG expression in thymocytes. *Eur J Immunol* 25, 54-58.

Krangel, M. S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat Immunol* 4, 624-630.

Kurimasa, A., Ouyang, H., Dong, L. J., Wang, S., Li, X., Cordon-Cardo, C., Chen, D. J., and Li, G. C. (1999). Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase: impact on lymphocyte development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1403-1408.

Lafaille, J. J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., and Tonegawa, S. (1989). Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59, 859-870.

Laurent, J., Bosco, N., Marche, P. N., and Ceredig, R. (2004). New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes. *Int Immunol* 16, 1069-1080.

Lauzurica, P., and Krangel, M. S. (1994). Temporal and lineage-specific control of T cell receptor alpha/delta gene rearrangement by T cell receptor alpha and delta enhancers. *JExpMed* 179, 1913-1921.

- Lee, A. I., Fugmann, S. D., Cowell, L. G., Ptaszek, L. M., Kelsoe, G., and Schatz, D. G. (2003). A functional analysis of the spacer of V(D)J recombination signal sequences. *PLoS Biol* *1*, E1.
- Lee, G. S., Neiditch, M. B., Sinden, R. R., and Roth, D. B. (2002). Targeted transposition by the V(D)J recombinase. *Mol Cell Biol* *22*, 2068-2077.
- Lee, J., and Desiderio, S. (1999). Cyclin A/CDK2 regulates V(D)J recombination by coordinating RAG-2 accumulation and DNA repair. *Immunity* *11*, 771-781.
- Lee, S. E., Mitchell, R. A., Cheng, A., and Hendrickson, E. A. (1997). Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol* *17*, 1425-1433.
- Lehar, S. M., Dooley, J., Farr, A. G., and Bevan, M. J. (2005). Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood* *105*, 1440-1447.
- Letourneur, F., Mattei, M. G., and Malissen, B. (1989). The mouse CD3-gamma, -delta, and -epsilon genes reside within 50 kilobases on chromosome 9, whereas CD3-zeta maps to chromosome 1, band H. *Immunogenetics* *29*, 265-268.
- Levelt, C. N., Mombaerts, P., Iglesias, A., Tonegawa, S., and Eichmann, K. (1993). Restoration of early thymocyte differentiation in T-cell receptor beta-chain-deficient mutant mice by transmembrane signaling through CD3 epsilon. *Proc Natl Acad Sci USA* *90*, 11401-11405.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* *88*, 323-331.
- Lewis, S., Gifford, A., and Baltimore, D. (1984). Joining of V kappa to J kappa gene segments in a retroviral vector introduced into lymphoid cells. *Nature* *308*, 425-428.
- Lewis, S., Gifford, A., and Baltimore, D. (1985). DNA elements are asymmetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes. *Science* *228*, 677-685.
- Li, Z., Dordai, D. I., Lee, J., and Desiderio, S. (1996). A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity* *5*, 575-589.
- Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H. L., Seed, B., Stamato, T. D., Taccioli, G. E., and Alt, F. W. (1995). The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* *83*, 1079-1089.
- Lieberman, M., Hansteen, G. A., Waller, E. K., Weissman, I. L., and Sen-Majumdar, A. (1992). Unexpected effects of the severe combined immunodeficiency mutation on murine lymphomagenesis. *J Exp Med* *176*, 399-405.

- Lin, W. C., and Desiderio, S. (1993). Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation. *Science* 260, 953-959.
- Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., and Petrie, H. T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127-134.
- Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A., and McGlade, C. J. (1999). The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* 9, 67-75.
- Liu, X., and Bosselut, R. (2004). Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat Immunol* 5, 280-288.
- Livak, F., Petrie, H. T., Crispe, I. N., and Schatz, D. G. (1995). In-frame TCR delta gene rearrangements play a critical role in the alpha beta/gamma delta T cell lineage decision. *Immunity* 2, 617-627.
- Livak, F., Welsh, S. C., Guidos, C. J., Crispe, I. N., Danska, J. S., and Schatz, D. G. (1996). Transient restoration of gene rearrangement at multiple T cell receptor loci in gamma-irradiated scid mice. *JExpMed* 184, 419-428.
- Liyanage, M., Weaver, Z., Barlow, C., Coleman, A., Pankratz, D. G., Anderson, S., Wynshaw-Boris, A., and Ried, T. (2000). Abnormal rearrangement within the alpha/delta T-cell receptor locus in lymphomas from Atm-deficient mice. *Blood* 96, 1940-1946.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes [see comments]. *Nature* 362, 847-849.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781-794.
- Malissen, B., and Malissen, M. (1996). Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr Opin Immunol* 8, 383-393.
- Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E., and Malissen, B. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *Embo J* 14, 4641-4653.
- Malissen, M., Gillet, A., Rocha, B., Trucy, J., Vivier, E., Boyer, C., Kontgen, F., Brun, N., Mazza, G., Spanopoulou, E., and et al. (1993). T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *Embo J* 12, 4347-4355.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., and Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T- cell development. *ImmunolToday* 13, 315-322.

- Mallick, C. A., Dudley, E. C., Viney, J. L., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1993). Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: a critical role for the beta chain in development. *Cell* 73, 513-519.
- Mancini, S., Candeias, S. M., Fehling, H. J., von Boehmer, H., Jouvin-Marche, E., and Marche, P. N. (1999). TCR alpha-chain repertoire in pTalpha-deficient mice is diverse and developmentally regulated: implications for pre-TCR functions and TCRA gene rearrangement. *J Immunol* 163, 6053-6059.
- Mancini, S. J., Candeias, S. M., Di Santo, J. P., Ferrier, P., Marche, P. N., and Jouvin-Marche, E. (2001). TCRA gene rearrangement in immature thymocytes in absence of CD3, pre-TCR, and TCR signaling. *J Immunol* 167, 4485-4493.
- Marculescu, R., Le, T., Simon, P., Jaeger, U., and Nadel, B. (2002). V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *J Exp Med* 195, 85-98.
- Mathieu, N., Hempel, W. M., Spicuglia, S., Verthuy, C., and Ferrier, P. (2000). Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination. *J Exp Med* 192, 625-636.
- Mauvieux, L., Villey, I., and de Villartay, J. P. (2003). TEA regulates local TCR-Jalpha accessibility through histone acetylation. *Eur J Immunol* 33, 2216-2222.
- Mertsching, E., Wilson, A., MacDonald, H. R., and Ceredig, R. (1997). T cell receptor alpha gene rearrangement and transcription in adult thymic gamma delta cells. *Eur J Immunol* 27, 389-396.
- Messier, T. L., O'Neill, J. P., Hou, S. M., Nicklas, J. A., and Finette, B. A. (2003). In vivo transposition mediated by V(D)J recombinase in human T lymphocytes. *Embo J* 22, 1381-1388.
- Michie, A. M., Soh, J. W., Hawley, R. G., Weinstein, I. B., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2001). Allelic exclusion and differentiation by protein kinase C-mediated signals in immature thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 609-614.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2004). Reduction in the developmental potential of intrathymic T cell progenitors with age. *J Immunol* 173, 245-250.
- Mizuta, R., Cheng, H. L., Gao, Y., and Alt, F. W. (1997). Molecular genetic characterization of XRCC4 function. *Int Immunol* 9, 1607-1613.
- Modesti, M., Hesse, J. E., and Gellert, M. (1999). DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *Embo J* 18, 2008-2018.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.

Monroe, R. J., Chen, F., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F. W. (1999a). RAG2 is regulated differentially in B and T cells by elements 5' of the promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12713-12718.

Monroe, R. J., Sleckman, B. P., Monroe, B. C., Khor, B., Claypool, S., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F. W. (1999b). Developmental regulation of TCR delta locus accessibility and expression by the TCR delta enhancer. *Immunity* 10, 503-513.

Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., *et al.* (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105, 177-186.

Murphy, W. J., Durum, S. K., Anver, M. R., Ferris, D. K., McVicar, D. W., O'Shea, J. J., Ruscetti, S. K., Smith, M. R., Young, H. A., and Longo, D. L. (1994). Induction of T cell differentiation and lymphomagenesis in the thymus of mice with severe combined immune deficiency (SCID). *J Immunol* 153, 1004-1014.

Mustelin, T., Williams, S., Tailor, P., Couture, C., Zenner, G., Burn, P., Ashwell, J. D., and Altman, A. (1995). Regulation of the p70zap tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur J Immunol* 25, 942-946.

Nadel, B., and Feeney, A. J. (1997). Nucleotide deletion and P addition in V(D)J recombination: a determinant role of the coding-end sequence. *Mol Cell Biol* 17, 3768-3778.

Nadel, B., Tang, A., Escuro, G., Lugo, G., and Feeney, A. J. (1998). Sequence of the spacer in the recombination signal sequence affects V(D)J rearrangement frequency and correlates with nonrandom Vkappa usage in vivo. *J Exp Med* 187, 1495-1503.

Naquet, P., Naspetti, M., and Boyd, R. (1999). Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin Immunol* 11, 47-55.

Neiditch, M. B., Lee, G. S., Huye, L. E., Brandt, V. L., and Roth, D. B. (2002). The V(D)J recombinase efficiently cleaves and transposes signal joints. *Mol Cell* 9, 871-878.

Nelson, W. G., and Kastan, M. B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53- dependent DNA damage response pathways. *MolCell Biol* 14, 1815-1823.

Ng, H. H., Xu, R. M., Zhang, Y., and Struhl, K. (2002). Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem* 277, 34655-34657.

- Nick McElhinny, S. A., Snowden, C. M., McCarville, J., and Ramsden, D. A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20, 2996-3003.
- Nicolas, N., Finnie, N. J., Cavazzana-Calvo, M., Papadopoulos, D., Le Deist, F., Fischer, A., Jackson, S. P., and de Villartay, J. P. (1996). Lack of detectable defect in DNA double-strand break repair and DNA-dependent protein kinase activity in radiosensitive human severe combined immunodeficiency fibroblasts. *Eur J Immunol* 26, 1118-1122.
- Nicolas, N., Moshous, D., Cavazzana-Calvo, M., Papadopoulos, D., de Chasseval, R., Le Deist, F., Fischer, A., and de Villartay, J. P. (1998). A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J Exp Med* 188, 627-634.
- Norian, L. A., and Koretzky, G. A. (2000). Intracellular adapter molecules. *Semin Immunol* 12, 43-54.
- Nunez-Cruz, S., Aguado, E., Richelme, S., Chetaille, B., Mura, A. M., Richelme, M., Pouyet, L., Jouvin-Marche, E., Xerri, L., Malissen, B., and Malissen, M. (2003). LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* 4, 999-1008.
- Nussenzweig, A., Sokol, K., Burgman, P., Li, L., and Li, G. C. (1997). Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13588-13593.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.
- Okamoto, Y., Douek, D. C., McFarland, R. D., and Koup, R. A. (2002). Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood* 99, 2851-2858.
- Ortiz, B. D., Cado, D., and Winoto, A. (1999). A new element within the T-cell receptor alpha locus required for tissue-specific locus control region activity. *Mol Cell Biol* 19, 1901-1909.
- Osipovich, O., Milley, R., Meade, A., Tachibana, M., Shinkai, Y., Krangel, M. S., and Oltz, E. M. (2004). Targeted inhibition of V(D)J recombination by a histone methyltransferase. *Nat Immunol* 5, 309-316.
- Page, D. M. (1999). Cutting edge: thymic selection and autoreactivity are regulated by multiple coreceptors involved in T cell activation. *J Immunol* 163, 3577-3581.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M., and Kourilsky, P. (1993). The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4319-4323.
- Pasqual, N., Gallagher, M., Aude-Garcia, C., Loiodice, M., Thuderoz, F., Demongeot, J., Ceredig, R., Marche, P. N., and Jouvin-Marche, E. (2002). Quantitative and qualitative

changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J Exp Med* 196, 1163-1173.

Penit, C., Lucas, B., and Vasseur, F. (1995). Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol* 154, 5103-5113.

Perkins, E. J., Nair, A., Cowley, D. O., Van Dyke, T., Chang, Y., and Ramsden, D. A. (2002). Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev* 16, 159-164.

Petrie, H. T., Livak, F., Schatz, D. G., Strasser, A., Crispe, I. N., and Shortman, K. (1993). Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med* 178, 615-622.

Pido-Lopez, J., Imami, N., Andrew, D., and Aspinall, R. (2002). Molecular quantitation of thymic output in mice and the effect of IL-7. *Eur J Immunol* 32, 2827-2836.

Poinsignon, C., de Chasseval, R., Soubeyrand, S., Moshous, D., Fischer, A., Hache, R. J., and de Villartay, J. P. (2004). Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage. *Eur J Immunol* 34, 3146-3155.

Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., and Pear, W. S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299-308.

Punt, J. A., Roberts, J. L., Kearse, K. P., and Singer, A. (1994). Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains. *J Exp Med* 180, 587-593.

Purugganan, M. M., Shah, S., Kearney, J. F., and Roth, D. B. (2001). Ku80 is required for addition of N nucleotides to V(D)J recombination junctions by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res* 29, 1638-1646.

Puthier, D., Joly, F., Irla, M., Saade, M., Victorero, G., Lloriod, B., and Nguyen, C. (2004). A general survey of thymocyte differentiation by transcriptional analysis of knockout mouse models. *J Immunol* 173, 6109-6118.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-558.

Ramsden, D. A., and Gellert, M. (1995). Formation and resolution of double-strand break intermediates in V(D)J rearrangement. *Genes Dev* 9, 2409-2420.

Redondo, J. M., Hata, S., Brocklehurst, C., and Krangel, M. S. (1990). A T cell-specific transcriptional enhancer within the human T cell receptor delta locus. *Science* 247, 1225-1229.

Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., and Salmon, P. (1996). An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87, 483-492.

Robey, E., Itano, A., Fanslow, W. C., and Fowlkes, B. J. (1994). Constitutive CD8 expression allows inefficient maturation of CD4+ helper T cells in class II major histocompatibility complex mutant mice. *J Exp Med* 179, 1997-2004.

Robey, E. A., and Bluestone, J. A. (2004). Notch signaling in lymphocyte development and function. *Curr Opin Immunol* 16, 360-366.

Rodewald, H. R., Awad, K., Moingeon, P., D'Adamio, L., Rabinowitz, D., Shinkai, Y., Alt, F. W., and Reinherz, E. L. (1993). Fc gamma RII/III and CD2 expression mark distinct subpopulations of immature CD4-CD8- murine thymocytes: in vivo developmental kinetics and T cell receptor beta chain rearrangement status. *J Exp Med* 177, 1079-1092.

Rodewald, H. R., Kretzschmar, K., Takeda, S., Hohl, C., and Dessing, M. (1994). Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization. *Embo J* 13, 4229-4240.

Rooney, S., Alt, F. W., Lombard, D., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Fleming, J., Fugmann, S., Ferguson, D. O., Schatz, D. G., and Sekiguchi, J. (2003). Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197, 553-565.

Roth, D. B., Menetski, J. P., Nakajima, P. B., Bosma, M. J., and Gellert, M. (1992). V(D)J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell* 70, 983-991.

Sagara, S., Sugaya, K., Tokoro, Y., Tanaka, S., Takano, H., Kodama, H., Nakauchi, H., and Takahama, Y. (1997). B220 expression by T lymphoid progenitor cells in mouse fetal liver. *J Immunol* 158, 666-676.

Samelson, L. E., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1985). Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43, 223-231.

Schatz, D. G., Oettinger, M. A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.

Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18, 273-275.

Schlissel, M., Constantinescu, A., Morrow, T., Baxter, M., and Peng, A. (1993). Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev* 7, 2520-2532.

Schlissel, M. S. (1998). Structure of nonhairpin coding-end DNA breaks in cells undergoing V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 18, 2029-2037.

Schmitt, T. M., de Pooter, R. F., Gronski, M. A., Cho, S. K., Ohashi, P. S., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2004). Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol* 5, 410-417.

Schmitt, T. M., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-756.

Schuler, W., Weiler, I. J., Schuler, A., Phillips, R. A., Rosenberg, N., Mak, T. W., Kearney, J. F., Perry, R. P., and Bosma, M. J. (1986). Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* 46, 963-972.

Scollay, R., and Godfrey, D. I. (1995). Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 16, 268-273; discussion 273-264.

Sempowski, G., Thomasch, J., Gooding, M., Hale, L., Edwards, L., Cifaloni, E., Sanders, D., Massey, J., Douek, D., Koup, R., and Haynes, B. (2001). Effect of thymectomy on human peripheral blood T cell pools in myasthenia gravis. *J Immunol* 166, 2808-2817.

Sempowski, G. D., Gooding, M. E., Liao, H. X., Le, P. T., and Haynes, B. F. (2002). T cell receptor excision circle assessment of thymopoiesis in aging mice. *Mol Immunol* 38, 841-848.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.

Shores, E. W., Tran, T., Grinberg, A., Sommers, C. L., Shen, H., and Love, P. E. (1997). Role of the multiple T cell receptor (TCR)-zeta chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. *J Exp Med* 185, 893-900.

Sikes, M. L., Meade, A., Tripathi, R., Krangel, M. S., and Oltz, E. M. (2002). Regulation of V(D)J recombination: a dominant role for promoter positioning in gene segment accessibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12309-12314.

Sleckman, B. P., Bardon, C. G., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F. W. (1997). Function of the TCR alpha enhancer in alphabeta and gammadelta T cells. *Immunity* 7, 505-515.

Sleckman, B. P., Bassing, C. H., Hughes, M. M., Okada, A., D'Auteuil, M., Wehrly, T. D., Woodman, B. B., Davidson, L., Chen, J., and Alt, F. W. (2000). Mechanisms that direct ordered assembly of T cell receptor beta locus V, D, and J gene segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7975-7980.

Sleckman, B. P., Carabana, J., Zhong, X., and Krangel, M. S. (2001). Assessing a role for enhancer-blocking activity in gene regulation within the murine T-cell receptor alpha/delta locus. *Immunology* 104, 11-18.

Sloan-Lancaster, J., Zhang, W., Presley, J., Williams, B. L., Abraham, R. T., Lippincott-Schwartz, J., and Samelson, L. E. (1997). Regulation of ZAP-70 intracellular localization: visualization with the green fluorescent protein. *J Exp Med* 186, 1713-1724.

Sommers, C. L., Menon, R. K., Grinberg, A., Zhang, W., Samelson, L. E., and Love, P. E. (2001). Knock-in mutation of the distal four tyrosines of linker for activation of T cells blocks murine T cell development. *J Exp Med* 194, 135-142.

Spanopoulou, E., Zaitseva, F., Wang, F. H., Santagata, S., Baltimore, D., and Panayotou, G. (1996). The homeodomain region of Rag-1 reveals the parallel mechanisms of bacterial and V(D)J recombination. *Cell* 87, 263-276.

Storek, J., Douek, D. C., Keesey, J. C., Boehmer, L., Storer, B., and Maloney, D. G. (2003). Low T cell receptor excision circle levels in patients thymectomized 25-54 years ago. *Immunol Lett* 89, 91-92.

Su, Y. W., Zhang, Y., Schweikert, J., Koretzky, G. A., Reth, M., and Wienands, J. (1999). Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur J Immunol* 29, 3702-3711.

Tabrizifard, S., Olaru, A., Plotkin, J., Fallahi-Sichani, M., Livak, F., and Petrie, H. T. (2004). Analysis of transcription factor expression during discrete stages of postnatal thymocyte differentiation. *J Immunol* 173, 1094-1102.

Taccioli, G. E., Amatucci, A. G., Beamish, H. J., Gell, D., Xiang, X. H., Torres Arzayus, M. I., Priestley, A., Jackson, S. P., Marshak Rothstein, A., Jeggo, P. A., and Herrera, V. L. (1998). Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity* 9, 355-366.

Talukder, S. R., Dudley, D. D., Alt, F. W., Takahama, Y., and Akamatsu, Y. (2004). Increased frequency of aberrant V(D)J recombination products in core RAG-expressing mice. *Nucleic Acids Res* 32, 4539-4549.

Thai, T. H., Purugganan, M. M., Roth, D. B., and Kearney, J. F. (2002). Distinct and opposite diversifying activities of terminal transferase splice variants. *Nat Immunol* 3, 457-462.

Thompson, S. D., Pelkonen, J., Rytönen, M., Samaridis, J., and Hurwitz, J. L. (1990). Nonrandom rearrangement of T cell receptor J alpha genes in bone marrow T cell differentiation cultures. *J Immunol* 144, 2829-2834.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.

Trigueros, C., Hozumi, K., Silva-Santos, B., Bruno, L., Hayday, A. C., Owen, M. J., and Pennington, D. J. (2003). Pre-TCR signaling regulates IL-7 receptor alpha expression promoting thymocyte survival at the transition from the double-negative to double-positive stage. *Eur J Immunol* 33, 1968-1977.

- Uematsu, Y., Ryser, S., Dembic, Z., Borgulya, P., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H., and Steinmetz, M. (1988). In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 52, 831-841.
- van Ewijk, W., Hollander, G., Terhorst, C., and Wang, B. (2000). Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127, 1583-1591.
- van Gent, D. C., McBlane, J. F., Ramsden, D. A., Sadofsky, M. J., Hesse, J. E., and Gellert, M. (1995). Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system. *Cell* 81, 925-934.
- van Gent, D. C., Ramsden, D. A., and Gellert, M. (1996). The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* 85, 107-113.
- van Oers, N. S., Lowin-Kropf, B., Finlay, D., Connolly, K., and Weiss, A. (1996). alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 5, 429-436.
- Vernooij, B. T., Lenstra, J. A., Wang, K., and Hood, L. (1993). Organization of the murine T-cell receptor gamma locus. *Genomics* 17, 566-574.
- Verschuren, M. C., Wolvers-Tettero, I. L., Breit, T. M., Noordzij, J., van Wering, E. R., and van Dongen, J. J. (1997). Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells. *J Immunol* 158, 1208-1216.
- Villey, I., Caillol, D., Selz, F., Ferrier, P., and de Villartay, J. P. (1996). Defect in rearrangement of the most 5' TCR-J alpha following targeted deletion of T early alpha (TEA): implications for TCR alpha locus accessibility. *Immunity* 5, 331-342.
- Vousden, K. H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Walker, A. I., Hunt, T., Jackson, R. J., and Anderson, C. W. (1985). Double-stranded DNA induces the phosphorylation of several proteins including the 90 000 mol. wt. heat-shock protein in animal cell extracts. *Embo J* 4, 139-145.
- Wang, B., Wang, N., Salio, M., Sharpe, A., Allen, D., She, J., and Terhorst, C. (1998). Essential and partially overlapping role of CD3gamma and CD3delta for development of alphabeta and gammadelta T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1375-1380.
- Wang, C., Bogue, M. A., Levitt, J. M., and Roth, D. B. (1999a). Irradiation-mediated rescue of T cell-specific V(D)J recombination and thymocyte differentiation in severe combined immunodeficient mice by bone marrow cells. *JExpMed* 190, 1257-1262.
- Wang, C., Bogue, M. A., Nguyen, A. P., and Roth, D. B. (1999b). Irradiation-induced rescue of thymocyte differentiation and V(D)J recombination in mice lacking the catalytic subunit of DNA- dependent protein kinase. *JImmunol* 163, 6065-6071.

- Wang, C., Bogue, M. A., Roth, D. B., and Meek, K. (1997). Normal junctional diversification of immune receptors in p53-deficient mice. *J Immunol* *159*, 757-762.
- Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B. J., Cado, D., and Robey, E. (1997). Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* *88*, 833-843.
- Wegener, A. M., Letourneur, F., Hoeveler, A., Brocker, T., Luton, F., and Malissen, B. (1992). The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* *68*, 83-95.
- Wei, X. C., Kishi, H., Jin, Z. X., Zhao, W. P., Kondo, S., Matsuda, T., Saito, S., and Muraguchi, A. (2002). Characterization of chromatin structure and enhancer elements for murine recombination activating gene-2. *J Immunol* *169*, 873-881.
- Weterings, E., Verkaik, N. S., Bruggenwirth, H. T., Hoeijmakers, J. H., and van Gent, D. C. (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res* *31*, 7238-7246.
- Whitehurst, C. E., Schlissel, M. S., and Chen, J. (2000). Deletion of germline promoter PD beta 1 from the TCR beta locus causes hypermethylation that impairs D beta 1 recombination by multiple mechanisms. *Immunity* *13*, 703-714.
- Wiest, D. L., Kearse, K. P., Shores, E. W., and Singer, A. (1994). Developmentally regulated expression of CD3 components independent of clonotypic T cell antigen receptor complexes on immature thymocytes. *J Exp Med* *180*, 1375-1382.
- Williams, C. J., Grandal, I., Vesprini, D. J., Wojtyra, U., Danska, J. S., and Guidos, C. J. (2001). Irradiation promotes V(D)J joining and RAG-dependent neoplastic transformation in SCID T-cell precursors. *Mol Cell Biol* *21*, 400-413.
- Wilson, A., de Villartay, J. P., and MacDonald, H. R. (1996). T cell receptor delta gene rearrangement and T early alpha (TEA) expression in immature alpha beta lineage thymocytes: implications for alpha beta/gamma delta lineage commitment. *Immunity* *4*, 37-45.
- Wilson, A., Ewing, T., Owens, T., Scollay, R., and Shortman, K. (1988). T cell antigen receptor expression by subsets of Ly-2-L3T4- (CD8-CD4-) thymocytes. *J Immunol* *140*, 1470-1476.
- Wilson, A., Held, W., and MacDonald, H. R. (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J Exp Med* *179*, 1355-1360.
- Winoto, A., and Baltimore, D. (1989). Alpha beta lineage-specific expression of the alpha T cell receptor gene by nearby silencers. *Cell* *59*, 649-655.
- Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H. R., and Radtke, F. (2002). Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* *16*, 869-879.

- Wu, G., Danska, J. S., and Guidos, C. J. (1996). Lck dependence of signaling pathways activated by gamma- irradiation and CD3 epsilon engagement in RAG-1(-/-)-immature thymocytes. *IntImmunol* 8, 1159-1164.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R., and Shortman, K. (1991a). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 174, 1617-1627.
- Wu, L., Scollay, R., Egerton, M., Pearse, M., Spangrude, G. J., and Shortman, K. (1991b). CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 349, 71-74.
- Yagita, H., Asakawa, J., Tansyo, S., Nakamura, T., Habu, S., and Okumura, K. (1989). Expression and function of CD2 during murine thymocyte ontogeny. *Eur J Immunol* 19, 2211-2217.
- Yarilin, A. A., and Belyakov, I. M. (2004). Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr Med Chem* 11, 447-464.
- Yasutomo, K., Doyle, C., Miele, L., Fuchs, C., and Germain, R. N. (2000). The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* 404, 506-510.
- Yu, W., Misulovin, Z., Suh, H., Hardy, R. R., Jankovic, M., Yannoutsos, N., and Nussenzweig, M. C. (1999). Coordinate regulation of RAG1 and RAG2 by cell type-specific DNA elements 5' of RAG2. *Science* 285, 1080-1084.
- Zhang, W., Sommers, C. L., Burshtyn, D. N., Stebbins, C. C., DeJarnette, J. B., Tribble, R. P., Grinberg, A., Tsay, H. C., Jacobs, H. M., Kessler, C. M., *et al.* (1999). Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10, 323-332.
- Zhang, X., Succi, J., Feng, Z., Prithivirajsingh, S., Story, M. D., and Legerski, R. J. (2004). Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Mol Cell Biol* 24, 9207-9220.
- Zhong, X. P., and Krangel, M. S. (1997). An enhancer-blocking element between alpha and delta gene segments within the human T cell receptor alpha/delta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5219-5224.
- Zhu, C., Bogue, M. A., and Roth, D. B. (1996). Thymocyte differentiation in gamma-irradiated severe-combined immunodeficient mice: characterization of intermediates and products of V(D)J recombination at the T cell receptor alpha locus. *EurJImmunol* 26, 2859-2865.
- Zhu, C., and Roth, D. B. (1995). Characterization of coding ends in thymocytes of scid mice: implications for the mechanism of V(D)J recombination. *Immunity* 2, 101-112.
- Zuniga-Pflucker, J. C. (2004). T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* 4, 67-72.

Zuniga-Pflucker, J. C., Jiang, D., Schwartzberg, P. L., and Lenardo, M. J. (1994). Sublethal gamma-radiation induces differentiation of CD4-/CD8- into CD4+/CD8+ thymocytes without T cell receptor beta rearrangement in recombinase activation gene 2-/- mice. *J Exp Med* 180, 1517-1521.

RESUME

La différenciation des lymphocytes T dans le thymus est strictement contrôlée par le réarrangement des gènes codants pour les chaînes du TCR et leur expression en surface dans le cadre du pré-TCR ou du TCR. Les souris incapables d'assembler un pré-TCR présentent un blocage précoce du développement des thymocytes. Nous avons montré que l'irradiation de souris CD3 ϵ ^{-/-}, qui sont déficientes en pré-TCR, restaure la différenciation des thymocytes par des voies différentes selon que p53 soit présente ou non. En réponse à l'irradiation, il existe une dissociation temporelle de l'activation des voies de signalisations contrôlant plusieurs événements co-régulés durant le développement des thymocytes. Ces voies sont cependant toutes deux centralisées au niveau de LAT. L'irradiation induit donc des voies de signalisations mimant les effets de l'activation du pré-TCR.

La différenciation radio-induite des thymocytes immatures s'accompagne du réarrangement *de novo* des gènes TCRA. L'étude des jonctions signal (JS) formées lors du réarrangement des gènes TCRA ne montre pas de différences de structure entre les JS de souris sauvages ou les JS formées suite à l'irradiation. Le réarrangement TCRA radio-induit est donc probablement l'œuvre de la machinerie de recombinaison traditionnelle. Contrairement au modèles actuels de recombinaison V(D)J les JS de souris sauvages analysées présentent des modifications, quels que soient les gènes réarrangés. Nous avons pu montrer une influence de plusieurs protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et le maintien de la stabilité du génome sur la structure des JS. Nous proposons que ces modifications ne sont pas le résultat d'un processus de recombinaison aberrant mais constituent une propriété intrinsèque de la recombinaison.

Nos travaux permettent donc une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J.

We have shown that irradiation of pre-TCR-deficient CD3 ϵ ^{-/-} mice restores thymocyte differentiation, by a p53-dependent and by a p53-independent pathway. Events normally associated during normal thymocyte development are dissociated in response to radiation exposure. Both of these pathways require LAT expression. Therefore, radiation exposure activates pre-TCR-like signals. TCRA gene rearrangement is induced following radiation exposure. The signal joints resulting from TCRA gene rearrangement have the same structure than those found in wild type mice.

All signal joint analyzed in un-manipulated wild type mice do exhibit junctional diversity. This diversity results mainly from TdT activity. We present evidences that proteins involved in DNA repair and genomic stability participated in SJ formation. We propose that signal joint diversity is not an aberrant process but is a key feature of V(D)J recombination.

All our work increases our understanding of molecular events associated with V(D)J recombination.